

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького
Кафедра біотехнології та радіології

БІОТЕХНОЛОГІЯ БІЛКІВ

Методичні вказівки для лабораторних робіт
здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»



Львів – 2024

Біотехнологія білків : методичні вказівки для лабораторних робіт здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. О. В. Штапенко, В. І. Буцяк, С. О. Слободян, Н. П. Кіт. Львів : Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 68°с.

Рецензент : Леськів Х. – кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри фармакології та токсикології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького.
Протокол № 8 від 24 жовтня 2024 р.

Основні вимоги з техніки безпеки

Працівники лабораторії зобов'язані дотримуватись наступних правил роботи:

1. У лабораторії можна працювати тільки в спеціальному одязі (халат, шапочка).
2. На робочому місці підтримувати чистоту і порядок.
3. Всі пляшки, флакони, колби і склянки після відбору реактиву відразу закривати корками і ставити на місце.
4. Щоб зберегти реактиви чистими, рештки невикористаної речовини не можна повертати в реактивні пляшки, флакони, колби і склянки. Реактиви загального користування не можна переносити на свої робочі місця.
5. Концентровані луги і кислоти наливати під витяжною шафою. При розбавленні концентрованих кислот завжди кислоту доливати у воду, а не навпаки.
6. Пробувати реактиви на смак, а також їсти та курити в лабораторії категорично забороняється.
7. При роботі з отруйними речовинами (спирти, ефіри, ацетон, бензол, фенол, солі важких металів тощо) дотримуватись застережних заходів, щоб уникнути попадання їх на шкіру і слизові оболонки.
8. У випадку попадання кислоти або лугу на руки чи обличчя необхідно швидко змити їх водою і нейтралізувати (кислоту – розчином питтєвої соди; луг – 2% розчином борної кислоти) і повторно промити водою.
9. Після закінчення роботи непотрібний біологічний матеріал, культури клітин та тканин повинні бути знищені. Інструменти, які використовувалися в роботі і поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.
10. Не можна залишати в лабораторії без догляду включені електричні прилади і газові пальники.

ТЕМА І. МЕТОДИ ДЕСТРУКЦІЇ КЛІТИН, ФРАКЦІОНУВАННЯ ЇХ ВМІСТУ. ОСНОВНІ МЕТОДИ ФРАКЦІОНУВАННЯ І ОЧИСТКИ БІЛКІВ.

Теоретичне обґрунтування

Білки – азотовмісні високомолекулярні органічні сполуки, які є основними складовими частинами живої клітини, виконують в організмі різноманітні важливі функції:

- **структурна** (беруть участь в утворенні структурної основи клітин та їх органів, формуванні покривних, сполучених тканин тощо);
- **каталітична** (понад 2000 білків проявляють ферментну активність);
- **рецепторна** (здійснюється передача та прийом сигналів поверхнею клітини, забезпечується міжклітинна взаємодія);
- **транспортна** (активний транспорт речовин та йонів крізь клітинні мембрани);
- **захисна** (забезпечують процеси зсідання крові та імунну реакцію організму);
- **механічна** (забезпечується рух, скорочення, розслаблення м'язів);
- **субстратно-енергетична** (за допомогою білків організм одержує близько 10-15% енергії).

Вони є основним пластичним матеріалом клітин, за хімічною будовою білки – це речовини з високою молекулярною масою, мономерами їх є α -амінокислоти L-ряду, які сполучені між собою пептидними (амідними) зв'язками.

Розчинні білки володіють властивостями колоїдних розчинів. Під впливом різних факторів білки коагулюють і випадають в осад. Як амфотерні електроліти в присутності кислот ведуть себе як основи, а в лужному середовищі – як кислоти. Білкові молекули в розчині можуть змінювати свій заряд залежно від рН середовища: в кислому середовищі білок набуває позитивного, а в лужному – негативного заряду. Навколо заряджених частинок виникають гідратні оболонки. Утворення однойменного заряду і гідратної оболонки – основні фактори агрегатної стійкості білкових колоїдів.

Всі білки прийнято ділити на прості білки або протеїни, і складні білки, або протеїди (комплекси білків з небілковими сполуками). Прості білки при гідролізі розщеплюються тільки до амінокислот. Складні білки – це двокомпонентні білки. Вони складаються з будь-якого простого білка та небілкового компонента.

Очищення білків – комплекс методів спрямованих на отримання чистого препарату певного білка із складної суміші, такої як клітинний екстракт. Розділити різні білки можливо на основі відмінностей у їх будові та властивостях, а саме за молекулярною масою, розміром молекул, специфічністю взаємодії з певними речовинами, а також розчинністю, зарядом, які залежать від температури, рН, йонної сили розчину та інших факторів. Очищення білків необхідне як для вивчення їхніх властивостей і функцій, так й для використання у промисловості, медицині і лабораторній практиці.

Джерелом для виділення і очищення білків переважно є зразки тканин або біомаса культивованих клітин. Першим етапом очищення білків є приготування лізатів або клітинних екстрактів шляхом руйнування плазматичних мембран клітин, а у випадку не тваринних клітин, ще й клітинних стінок. Після цього лізати можуть підлягати диференційному центрифугуванню, яке дозволяє отримати препарати збагачені потрібними субклітинними фракціями (наприклад, ядрами, мітохондріями, мікросомами тощо). Для концентрації і фракціонування білків може бути використане висолювання, позбутись від низькомолекулярних домішок можна за допомогою діалізу. Остаточне очищення білків відбувається при застосуванні різних видів хроматографії, гель-електрофорезу, ізоелектричного фокусування або їх комбінації.

Методи деструкції клітин

Хоча позаклітинні білки більш стабільні ніж внутрішні, більша частина білків локалізована всередині клітин. Існує багато методів руйнування клітин, що обумовлено різноманітністю типів клітин (еритроцити, які легко руйнуються та клітини деяких бактерій, для руйнування яких необхідна сильна механічна дія). Тому методи руйнування клітин поділяють за силою дії.

Після руйнування тканин отримуємо гомогенат, а після руйнування клітин отримуємо лізат, після його центрифугуванням та осадження нерозчинного матеріалу отримують екстракт. При отриманні екстракту втрати білка за рахунок утримування рідини осадом не повинні становити 20%. Бактерії, дріжджі та подібні до них гриби з товстою клітинною стінкою дають осад, об'єм якого практично дорівнює первинному об'єму клітинного матеріалу. Це впливає на кількість буферного розчину, який треба додати.

Лабораторна робота №1

Руйнування популяції *Escherichia coli* лізоцимом яєчного білка

Мета роботи. Ознайомитися з особливостями руйнування мікробної популяції *Escherichia coli* лізоцимом яєчного білка.

Завдання роботи. Провести руйнування добової культури *Escherichia coli* вирощена в чашках Петрі на агаризованому середовищі лізоцимом яєчного білка.

Матеріали та реактиви.

Добова культура *Escherichia coli* вирощена в чашках Петрі на агаризованому середовищі, фосфатносолевий буфер, рН 7,0, 1 мМ ЕДТА, 0,2 мг/мл лізоциму яєчного білка, 10 мкг/мл 0,3 М дезоксирибонуклеази.

Хід роботи.

1. Добову культуру *E. coli* на агарі змивають 1мл буфера.
2. До суспензії клітин додають екстрагуючий буфер (20 мМ фосфатносолевий буфер, рН 7,0 та 1 мМ ЕДТА), який містить 0,2 мг/мл лізоциму яєчного білка та 10 мкг/мл 0,3 М дезоксирибонуклеази. Обробка отриманого екстракту дезоксирибонуклеазою поліпшує його якість, завдяки зменшенню в'язкості рідини.
3. Суспензію клітин з буфером перемішують 15 хв за 37°C
4. Суспензію клітин центрифугують за 15000 g 20 хв.
5. Роблять висновок.

1.1. Основні методи фракціонування і очистки білків

Теоретичне обґрунтування

Висолювання білків пов'язано з розчиненням солей у розчині, який містить білки. При цьому важлива природа солі. За здатністю до висолювання аніони солей розміщуються у ряд Гофмейстера: SCN^- , I^- , ClO_4^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- , CH_3COO^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} . Щодо ефективності дії катіонів на осадження білків, то моновалентні йони можна розмістити так: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$.

При виборі солі необхідно враховувати якість цільового препарату, розчинність та особливості, пов'язані з нагріванням розчину. Сіль амонію сульфату має усі переваги та не має недоліків при роботі з типовим білком, окрім випадків коли треба працювати при високих рН.

Розчинність $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ мало змінюється у діапазоні 0-30°C, концентрація насиченого розчину у воді становить 4 М.

Щільність цього розчину складає $1,235 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$, а щільність білка дорівнює $1,29 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$. Кількість солі, яку треба додати для отримання необхідної концентрації можна вирахувати за допомогою формули, а можна знайти у таблицях. Краще всього працювати при нейтральних значеннях рН (6,0–7,5). Фракціонування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ має важливу перевагу – він призводить до стабілізації білків. Суспензія білкового осаду у 2 – 3 М розчині $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ стабільна впродовж років. Це звичайний метод збереження комерційних препаратів. Висока концентрація солі попереджає протеоліз та дію бактерій. У багатьох випадках після фракціонування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ використовують більш складні методи – йонообмінну або афінну хроматографію.

Лабораторна робота №2

Очищення білків шляхом висолювання

Мета роботи. Ознайомитися з особливостями очищення білків шляхом висолювання.

Завдання роботи. Навчитися осаджувати білки насиченим розчином амонію сульфату та фракціювати їх на альбуміни та глобуліни.

Теоретичне обґрунтування

Зворотне осадження білків (висолювання) передбачає випадання білка в осад під дією певних речовин, після видалення яких він знову повертається у свій вихідний (нативний) стан. Для висолювання білків використовують солі лужних і лужноземельних металів (найчастіше в практиці використовують сульфат натрію і амонію). Ці солі видаляють водну оболонку (викликають зневоднення) і знімають заряд. Між величиною водної оболонки білкових молекул і концентрацією солей існує пряма залежність: чим менша гідратна оболонка, тим менше потрібно солей. Так, глобуліни, що мають великі і важкі молекули і невелику водну оболонку, випадають в осад при неповному насиченні розчину солями, а альбуміни як дрібніші молекули, оточені великою водною оболонкою випадають в осад при повному насиченні.

Матеріали та реактиви.

Розчин білка, насичений розчин амоній сульфату (приготування насиченого розчину сульфату амонію проводять наступним чином: 800,0 г амонію сульфату чистого від домішок металів додають до 1000 мл дистильованої води за температури 35°C, постійно струшуючи впродовж 2 годин. Після чого температуру знижують до +4°C (залишають на ніч у холодильнику). Оскільки деякі партії амонію сульфату мають кислу реакцію слід довести рН розчину до нейтрального значення слабким розчином амоніаку. Готовий препарат можна зберігати впродовж року), біуретовий реактив: до 250 мл H₂O додають 0,75 г CuSO₄·5 H₂O і 3 г калій-натрій виннокислий, потім 150 мл 10% NaOH і 1 г KJ. Загальний об'єм доводять дистильованою водою до 1 л.

Хід роботи.

В пробірку наливають 2 мл розчину білка і 2 мл насиченого розчину амоній сульфату. Утворюється напівнасичений розчин. В осад випадають глобуліни, які відділяють від альбумінів фільтруванням. До другої частини фільтрату додають кристалічного амоній сульфату до повного насичення розчину. В осад випадають альбуміни. Фільтрують і перевіряють наявність білка у фільтраті біуретовою реакцією. Роблять висновки.

1.2. Властивості простих білків

Лабораторна робота 3.

Реакції осадження білків та визначення ізоелектричної точки білка (желатину)

Мета роботи. Ознайомитися із незворотними методами осадження білків та роллю ізоелектричної точки білка в цьому процесі.

Завдання роботи. В лабораторних умовах провести осадження білків нагріванням, мінеральними кислотами, йонами важких металів, органічними розчинниками, хлористим натрієм та визначити ізоелектричну точку желатину.

Теоретичне обґрунтування

Незворотне осадження пов'язане з глибокими внутрімолекулярними змінами структури білка, що призводить до втрати ними природних

властивостей – денатурації, яка тягне за собою втрату розчинності, біологічної активності і т.д. Незворотне осадження можна викликати кип'ятінням, дією концентрованими розчинами деяких з мінеральних і органічних кислот, органічних розчинників, солями важких металів. Мінеральні та деякі органічні кислоти, органічні розчинники осаджують білки внаслідок денатурації та дегідратації білкових молекул, а також в результаті утворення комплексних солей кислот з білками. Солі важких металів (Купруму, Ртуті, Цинку, Плюмбуму) осаджують білки в результаті утворення комплексних сполук з сульфгідрильними групами білків.

Розщеплення білків у шлунку, де рН середовища рівне 0,5-1,5, під дією протеолітичних ферментів є прикладом природного розщеплення. Денатурація білків покладена в основу лікування отруєння важкими металами, коли хворому вводять per os (“через рот”) молоко або сирі яйця з тим, щоб метали адсорбувалися на поверхні денатуруючого білка і не діяли на білки слизової оболонки шлунка і кишечника, а також не всмоктувалися в кров. Гідроліз білка досягається за допомогою кип'ятіння білка з сильними мінеральними кислотами (кислотний гідроліз) або основами (лужний гідроліз).

Найкращий спосіб осадження білків – кип'ятіння у середовищах, зі значенням рН, рівним ізоелектричній точці білків. Ізоелектрична точка білка – це таке значення рН розчину, при якому сумарний заряд білкової молекули дорівнює нулю. Білок в *ізоелектричному стані* є нестабільним і легко осаджується.

Матеріали та реактиви.

1% розчин яєчного білка, насичений розчин хлориду натрію, 10% розчин гідроксиду натрію, концентрована азотна кислота, 0,1 М розчин ацетатної кислоти, 0,1% розчин сульфату Купруму, 1% розчин ацетату Купруму, 95% розчин ацетону

Обладнання

Складчасті паперові фільтри, скляні палички, пробірки зі штативом, крапельниці, піпетки градуйовані, пробірки центрифужні, пальник, водяна баня.

Хід роботи

А. Осадження білків нагріванням. Щоб порівняти залежність осадження білків від концентрації водневих йонів у 5 пробірок додають

по 3 мл розчину яєчного білка. Нейтральний розчин білка в першій пробірці нагрівають до кипіння. Вміст у першій пробірці мутнішає, спостерігається опалесценція, що зумовлена руйнуванням гідратної оболонки навколо молекули білка та збільшенням білкових часток. Але міцели білка заряджені й тому залишаються у розчині, не випадаючи в осад.

Розчин у другій пробірці нагрівають до кипіння, вливають 1 мл розчину ацетатної кислоти до появи слабо-кислої реакції. Внаслідок відстоювання білок випадає в осад. За цих умов частинки білка втрачають заряд, тому що рН середовища близька до ізоелектричного стану.

В третю пробірку вносять 1 мл розчину ацетатної кислоти для створення кислої реакції середовища. Кип'ятять. Під час кип'ятіння розчину осад не утворюється, оскільки молекули білка набувають позитивного заряду, що підвищує їх стійкість.

У четверту пробірку додають 1 мл розчину ацетатної кислоти, 2 мл насиченого розчину хлориду натрію та нагрівають. Випадає білий осад. Його утворення викликане тим, що білок внаслідок взаємодії з йонами хлориду натрію втрачає свій заряд.

У п'яту пробірку вносять 2 мл розчину гідроксиду натрію для створення лужного середовища. Кип'ятять. Під час кип'ятіння рідини осад не утворюється, оскільки в лужному середовищі збільшується від'ємний заряд.

Б. Осадження білків мінеральними кислотами. В пробірку вносять 3 мл концентрованої азотної кислоти. Потім по стінкам пробірки обережно, щоб рідини не перемішувалися, додають 3 мл розчину яєчного білка. На межі розподілу двох рідин утворюється осад у вигляді білкового кільця (проба Геллера). Вміст перемішують, доливають надлишок азотної кислоти й пересвідчуються, що осад не зникає.

В. Осадження білків йонами важких металів. У дві пробірки додають по 3 мл розчину яєчного білка. В першу – дві-три краплі розчину сульфату Купруму, в другу – дві-три краплі розчину ацетату Плюмбуму. Спостерігають утворення осаду (з сіллю Купруму – блакитного кольору, Плюмбуму – білого). Внаслідок додавання надлишку розчинів сульфату Купруму та ацетату Плюмбуму осад, що утворився, розчиняється.

Г. Осадження білків органічними розчинниками. У пробірку вносять 3 мл розчину яєчного білка. Потім додають 3 мл ацетону. Розчин у пробірці мутнішає. Якщо до неї додати 1 мл насиченого розчину хлориду натрію, через деякий час білок випадає в осад.

Д. Осадження білків хлористим натрієм. У пробірку вносять 3 мл розчину яєчного білка та хлорид натрію до повного насичення. Через кілька хвилин в осад випадають глобуліни. Суміш фільтрують через складчастий паперовий фільтр. У фільтраті містяться альбуміни, які не осаджуються. До фільтрату додають 1 мл розчину ацетатної кислоти й нагрівають суміш до кипіння на водяній бані. Альбуміни випадають в осад.

Визначення ізоелектричної точки желатину

Принцип методу.

Визначення ізоелектричної точки білків ґрунтується на здатності білків легко осаджуватися у середовищі із значенням рН, що відповідає їх ізоелектричній точці, під дією речовин, які спричиняють дегідратацію білків.

Матеріали та реактиви.

1% розчин желатину, 0,01, 0,1 і 1 М розчини ацетатної кислоти, 0,1 М розчин ацетату натрію, 95% ацетон

Обладнання

Скляні палички, пробірки, градуйовані піпетки, штатив для пробірок.

Хід роботи

У шість пробірок додають відповідну кількість розчинів ацетатної кислоти, ацетату натрію, дистильованої води для створення відповідного рН у розчині. Потім у всі пробірки додають розчин желатину (табл. 1). Вміст кожної пробірки перемішують. Після цього у всі пробірки повільно по стінці додають по 2 мл ацетону. Через 30 хв визначають ізоелектричну точку, тобто знаходять пробірку з максимальним ступенем помутніння розчину.

Таблиця 1. Співвідношення компонентів реакційної суміші, мл, для визначення ізоелектричної точки желатину

Вода	CH ₃ COOH (0,1 М)	CH ₃ COOH (0,1 М)	CH ₃ COONa (0,1 М)	Розчин желатину, 1%	рН середовища
3,8	0,2	-	2,0	2,0	5,6
3,5	0,5	-	2,0	2,0	5,3
3,0	1,0	-	2,0	2,0	5,0
2,0	2,0	-	2,0	2,0	4,7
-	4,0	-	2,0	2,0	4,4
3,8	-	0,2	2,0	2,0	4,1

ТЕМА II. КІЛЬКІСНІ ТА ЯКІСНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДОВИХ БІЛКІВ

Кольорові реакції на білки та продукти їх розпаду

Теоретичне обґрунтування

При взаємодії білка з окремими хімічними речовинами виникають забарвлені продукти реакції. Є загальні кольорові реакції, які дають усі білки (біуретова та нінгідрінова) і специфічні. Перші зумовлюють наявність пептидного зв'язку у молекулі білка, а другі – наявністю окремих амінокислот (реакції: ксантинопротеїнова, Міллона, Фоля та ін.). кольорові реакції використовуються для кількісного і якісного визначення білка і наявних у ньому окремих амінокислот.

Лабораторна робота № 4.

Визначення концентрації мікробного білка за допомогою біуретової реакції та реакцією Лоурі

Мета роботи. Ознайомитися з методами визначення концентрації мікробного білка.

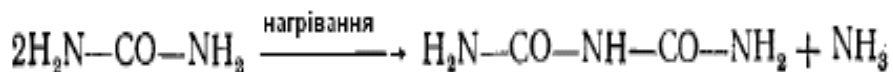
Завдання роботи. Визначити концентрацію білка за допомогою біуретової реакції та реакцією Лоурі.

Принцип реакції.

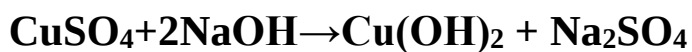
Сполуки амінокислот, які містять не менше двох пептидних зв'язків ($-\text{CO}-\text{NH}-$), у лужному середовищі за наявності сульфату Купруму (II) утворюють комплекси з атомами Купруму, що забарвлені в фіолетовий колір.

Вперше реакція утворення таких комплексних сполук купруму була проведена з біуретом, що і зумовило назву «біуретова».

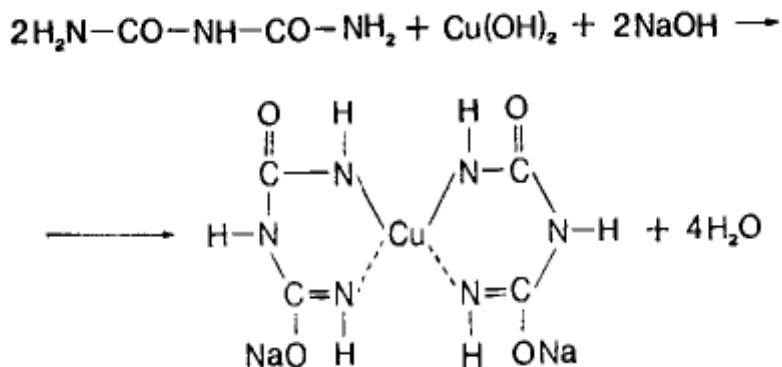
Біурет, який можна отримати під час нагрівання сечовини до температури 180°C , не є амінокислотою, але має два пептидні зв'язки:



Гідроксид Купруму (II) для проведення біуретової реакції одержують, як правило, в результаті реакції взаємодії сульфату Купруму (II) з гідроксидом натрію (калію):



Комплекс біурету з Купрумом утворюється за схемою:



При додаванні до білкового розчину лужного розчину Купруму з'являється фіолетове забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації білка. Забарвлення обумовлене наявністю у структурі мікробного білка пептидних зв'язків.

Матеріали та реактиви.

Біуретовий реактив: до 250 мл H_2O додають 0,75 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 3 г калій-натрій виннокислий, потім 150 мл 10% NaOH і 1 г KJ . Загальний об'єм доводять дистильованою водою до 1 л.

Розчин альбуміну ($C=10$ мг/мл).

Хід роботи.

Для визначення вмісту білка у пробі беруть 7 пробірок. 5 з них необхідні для побудови калібрувальної кривої. Для цього у 5 пробірок вносять 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл розчину, який містить альбумін (з концентрацією 10 мг/мл), що відповідає 2, 4, 6, 8, 10 мг відповідно. Загальний об'єм у пробірках доводять до 1 мл дистильованою водою (табл. 2).

У шосту контрольну пробірку вносять лише 1 мл води, білок тут відсутній. У сьому пробірку вносять 1 мл досліджуваного білкового розчину. Після цього у кожену пробірку додають по 4 мл біуретового реактиву.

Таблиця 2. Співвідношення об'ємів води та розчинів білка для побудови калібрувального графіку та розрахунку вмісту досліджуваного білка.

№ пробірки	V_{H_2O} , мл	$V_{білка}$, мл	$V_{білка}$, мг/мл
1	-	1,0	10
2	0,2	0,8	8
3	0,4	0,6	6
4	0,6	0,4	4
5	0,8	0,2	2
6	1,0	-	0
7	-	1,0	x

Вміст пробірок перемішують і залишають на 30 хв за кімнатної температури. Інтенсивність забарвлення визначають кольорометрично за довжини хвилі 540 нм. Визначення проводять проти розчину з контрольної проби, що містить всі компоненти, окрім білка (шоста пробірка).

Обробка результатів.

Отримані дані відображають графічно, відкладаючи на осі абсцис концентрацію білка (С, мг/мл), а на осі ординат – значення оптичної густини, що відповідає даній кількості. Вимірявши величину оптичної густини досліджуваного зразка, за допомогою калібрувального графіку визначають вміст білка у цих зразках та роблять висновок.

Визначення концентрації білка реакцією Лоурі

1. Приготування реактивів

Реактив А. Розчиняють 0,5 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ і 1,0 г натрію цитрату в 100 мл води. Цей розчин стійкий та зберігається тривалий час.

Реактив В. 20,0 г Na_2CO_3 та 4,0 г NaOH розчиняють у 1 л води.

Реактив С. До 50 мл реактиву В додають 1 мл реактиву А.

Реактив D. До 10 мл реактива Фоліна–Чіокалтеу (готовий реактив замовляється) додають 10 мл води.

2. Визначення концентрації білка. До 0,5 мл розчину білка невідомої концентрації (не більше 0,5 мг) додають 2,5 мл реактиву С, перемішують та залишають на 10 хв, додають 0,25 мл реактиву D. Розчин ретельно перемішати та залишити на 20 хв. Після появи забарвлення вимірюють оптичну щільність при довжині хвилі між 600–750 нм.

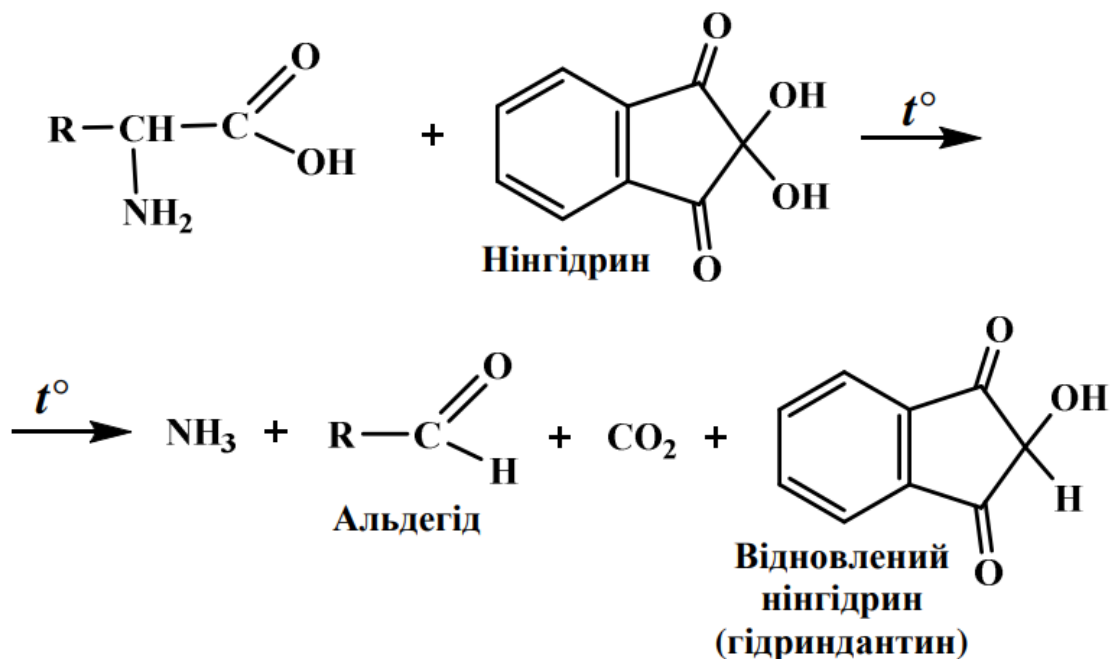
3. Роблять висновок

Лабораторна робота № 5.

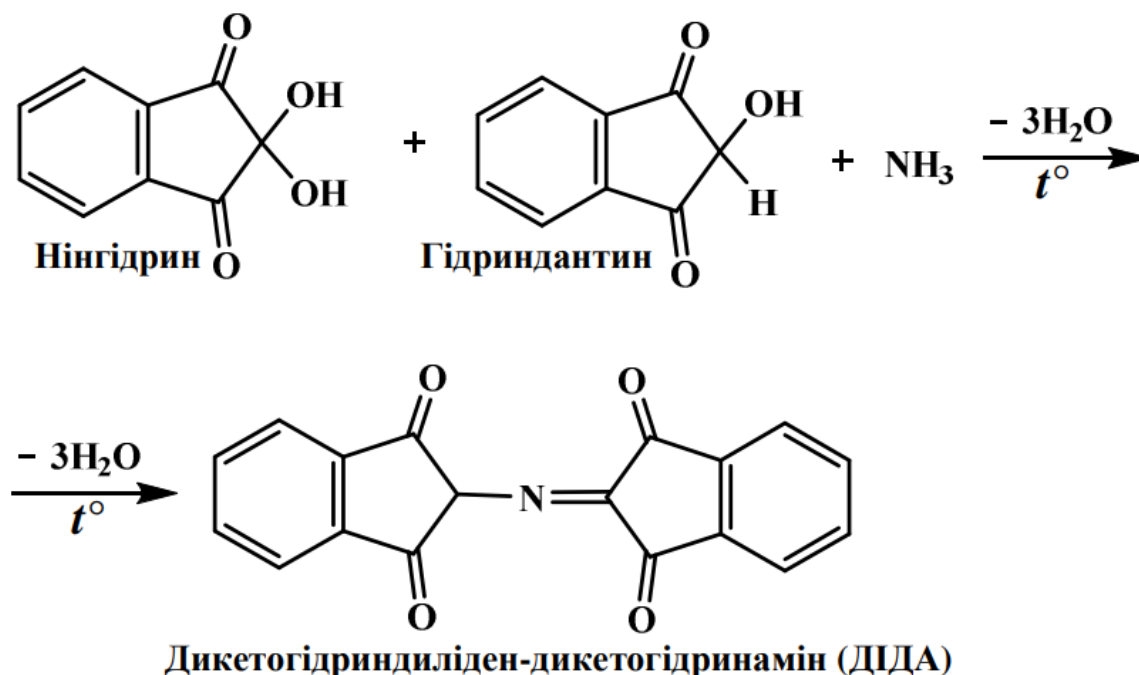
Виявлення α -амінокислот у складі білків (нінгідринова реакція)

У результаті взаємодії α -амінокислоти з нінгідрином (трикетогідринденгідратом) утворюється забарвлена комплексна сполука. Під час першої стадії реакції при нагріванні до 70°C α -амінокислоти окиснюються нінгідрином та підлягають окисному дезамінуванню з утворенням аміаку та декарбоксилюванню з формуванням альдегіду й CO_2 , а нінгідрин відновлюється (1):

1)



2)



Відновлений нінгідрин на другій стадії реакції конденсується з аміаком і окисненим нінгідрином й утворює сполуку, яка, енолізуючись, переходить у забарвлену форму синьо-фіолетового кольору (2).

Матеріали та реактиви. Водний 1%-й розчин гліцину, 0,1%- й розчин нінгідрину в 95%-му розчині ацетону.

Обладнання. Скляні палички, пробірки, крапельниці, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, штатив для пробірок.

Хід роботи. До 1 мл 1%-го розчину яєчного білка додають три краплі 1%-го розчину нінгідрину в 95%-му розчині ацетону. Суміш перемішують і ставлять на водяну баню за температури 82 70°C на 5 хв. Спостерігають утворення синьо-фіолетового забарвлення, яке свідчить про наявність у молекулі білка залишків α -амінокислот. Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

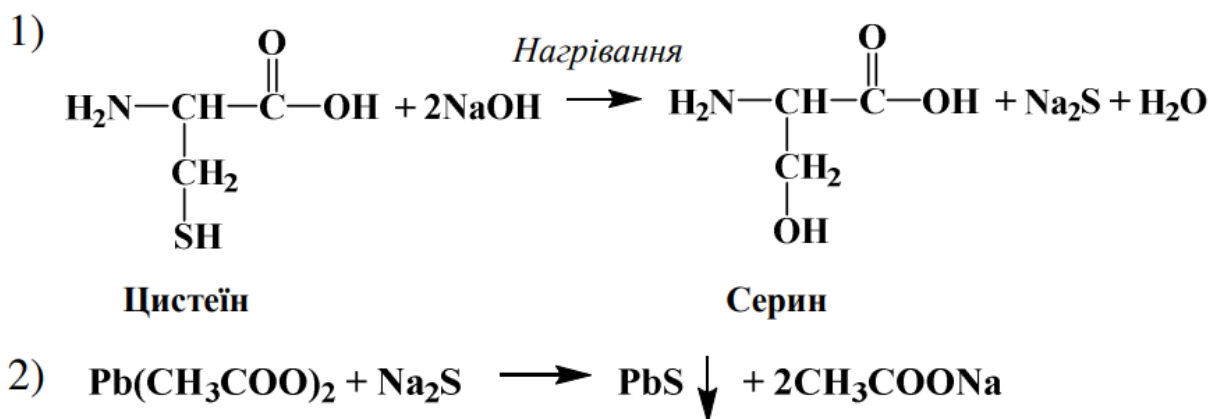
Лабораторна робота № 6.

Виявлення у складі білків залишків сірковмісних амінокислот цистеїну й цистину (реакція Фоля)

При тривалому нагріванні рідина, що містить сірковмісні амінокислоти (цистеїн, цистин, метіонін) і білки, в яких присутні ці амінокислоти, набуває бурого кольору, і випадає чорний осад сірчистого свинцю. Реакція проходить у дві стадії: перша стадія – перехід сірки із органічної сполуки в неорганічну; друга стадія – якісне виявлення сірки в розчині.

Під час кип'ятіння цистеїну та цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді сірководню, який в лужному середовищі утворює сульфід натрію.

Сульфід натрію можна виявити за допомогою важких металів, наприклад, іонів свинцю, які утворюють з іонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору. Для цього можна використати ацетат свинцю. Рівняння реакції за участю цистеїну має такий вигляд:



Матеріали та реактиви. Водний 0,01%-й розчин цистеїну, реактив Фоля (до 10%-го розчину ацетату свинцю додають 10%- й розчин гідроксиду натрію до розчинення осаду, що утворився), концентрований розчин гідроксиду натрію.

Обладнання. Скляні палички, штатив із пробірками градуйованими, піпетки, водяна баня, годинник.

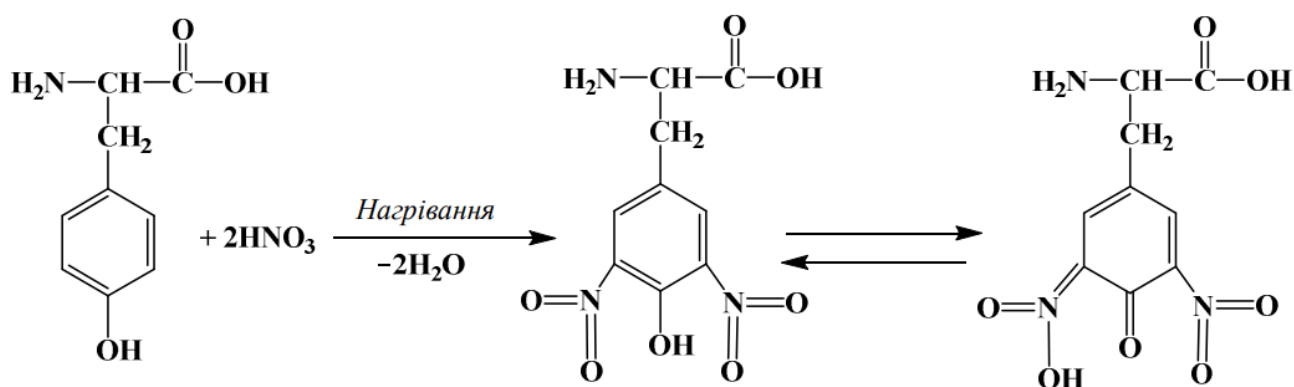
Хід роботи. До 3 мл 1%-го розчину яєчного білка додають 3 мл реактиву Фоля (див. лабораторну роботу 2.1, дослід 4) й після перемішування кип'ятять на водяній бані протягом 2 хв. Після охолодження спостерігають утворення бурого чи чорного осаду, який свідчить про наявність у молекулі білка залишків цистеїну та цистину.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

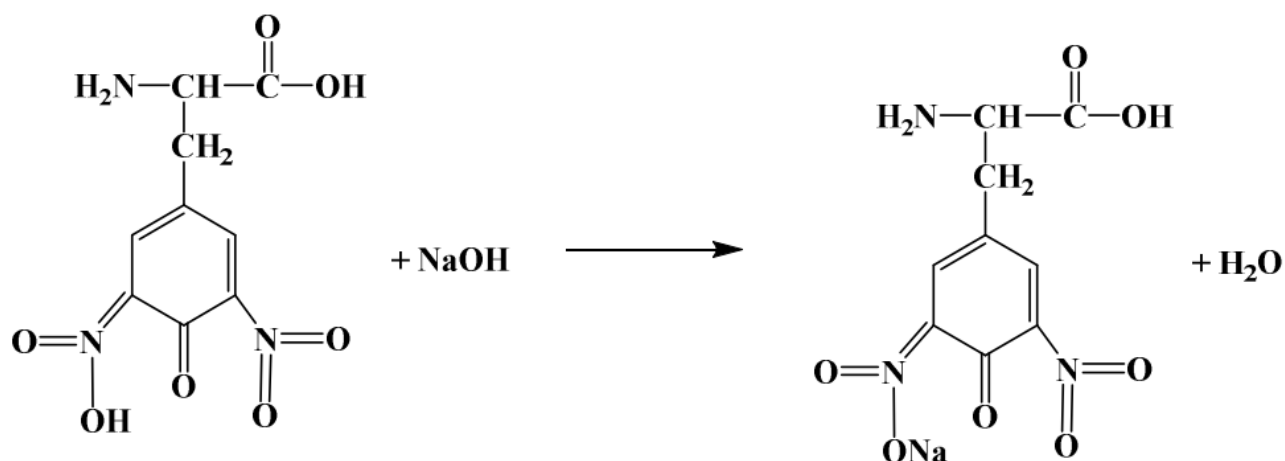
Лабораторна робота № 7.

Виявлення у складі білків ароматичних амінокислот (ксантопротеїнова реакція)

В ароматичних амінокислотах, які містять бензольні кільця (тирозин, триптофан, фенілаланін) під дією азотної кислоти здійснюється реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої у жовтий колір нітросполуки. Наприклад, реакція нітрування тирозину:



У реакції гідроксиду натрію з хіноїдною формою динітротирозину утворюється натрієва сіль динітротирозину, яка має оранжеве забарвлення:



Матеріали та реактиви. Водний 0,01%-й розчин тирозину, концентрована азотна кислота, 10%-й розчин гідроксиду натрію.

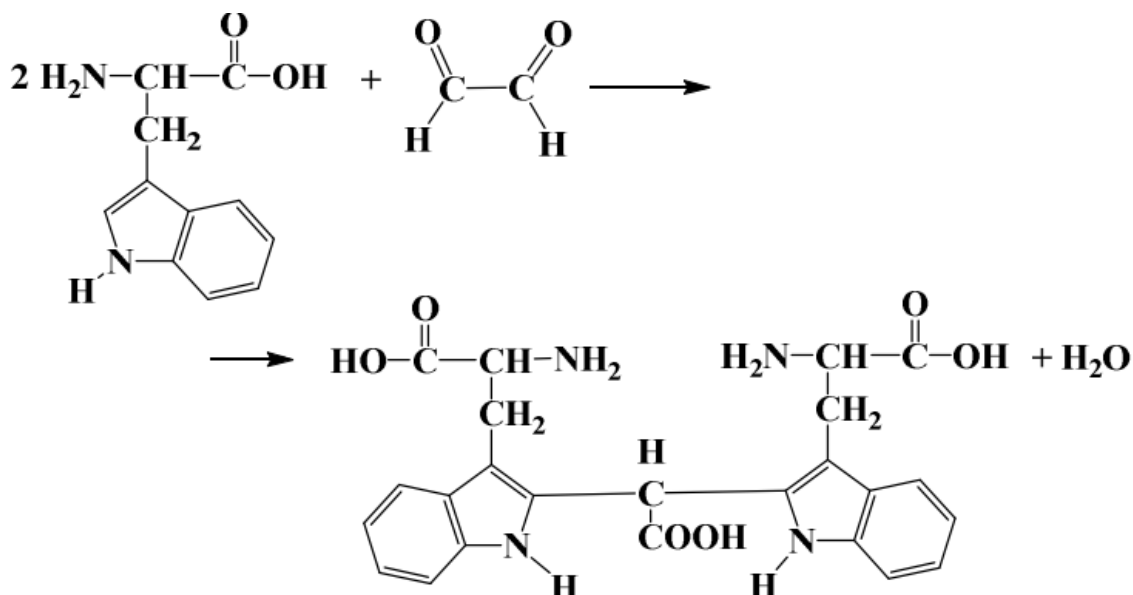
Обладнання. Скляні палички, пробірки, штатив для градуйованих пробірок, піпетки, пальник.

Хід роботи. До 3 мл 1%-го розчину яєчного білка додають 1 мл концентрованої азотної кислоти. Суміш перемішують і обережно нагрівають до появи жовтого забарвлення. Спостереження записують у зошит, роблять висновок

Лабораторна робота № 8.

Виявлення триптофану в складі білків реакцією Адамкевича

Триптофан у кислому середовищі вступає в реакцію з гліоксиловою кислотою (альдегідами), утворюючи забарвлені в червоно-фіолетовий колір продукти конденсації:



Матеріали та реактиви. Водний 0,01%-й розчин триптофану, льодяна оцтова кислота, концентрована сірчана кислота.

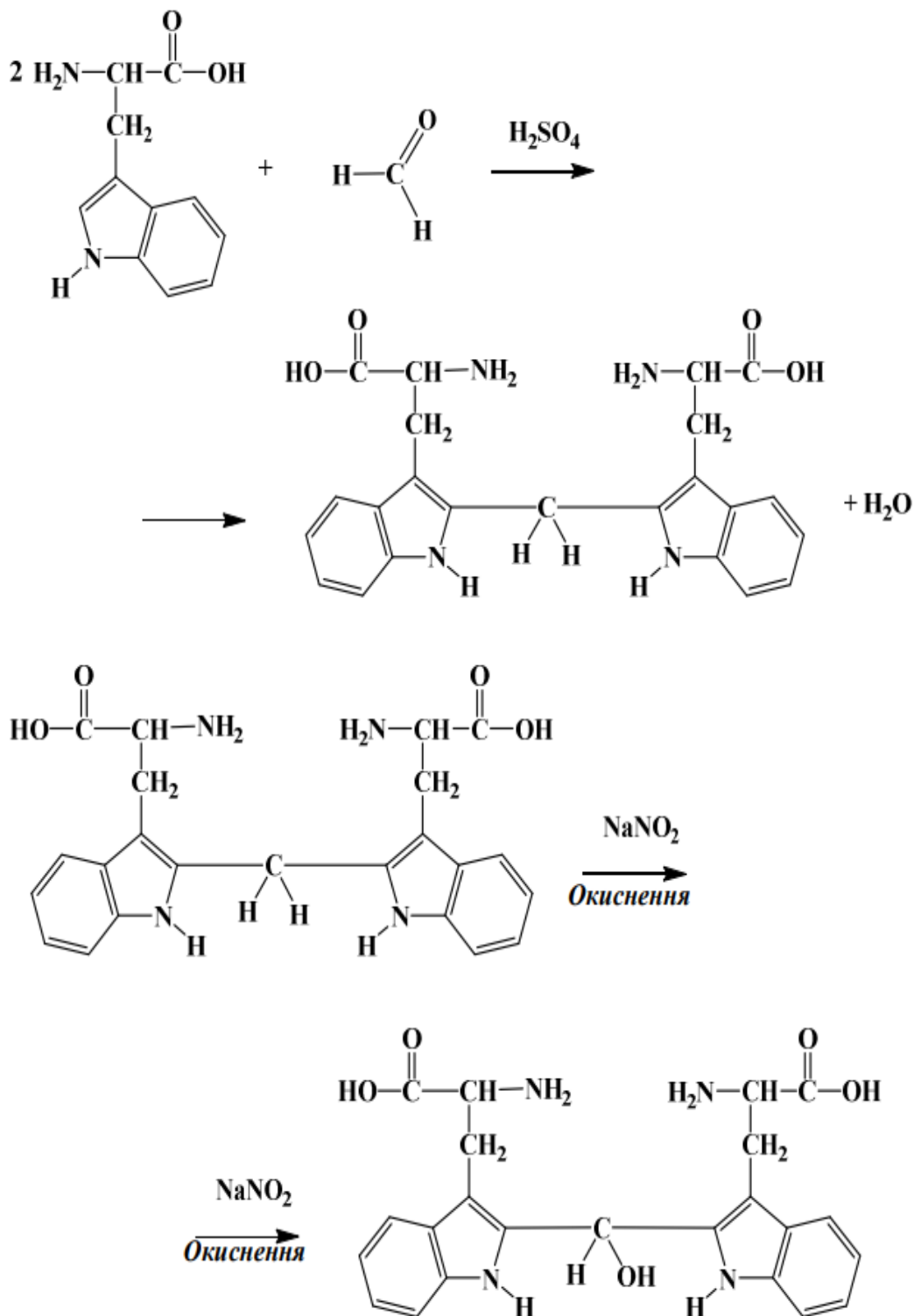
Обладнання. Пробірки градуйовані, піпетки, штатив для пробірок, водяна баня, годинник.

Хід роботи. До 0,5 мл 1%-го розчину яєчного білка додають 0,5 мл льодяної оцтової кислоти, яка містить невеликі кількості гліоксилової кислоти. Суміш нагрівають до розчинення осаду, що утворюється. До охолодженої суміші потім обережно (краплями) по стінці пробірки вливають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти так, щоб суміші не перемішувалися. Через 10 хв на межі розподілу двох рідин утворюється червоно-фіолетове кільце. Реакцію можна прискорити, поставивши пробірку в киплячу водяну баню. Чутливість реакції збільшується, якщо в реагуючу суміш додати невелику кількість міді (п'ять – десять крапель 0,04 моль/л сульфату міді). Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Лабораторна робота № 9.

Виявлення триптофану в складі білків реакцією Вуазене

Триптофан, конденсуючись із формальдегідом, утворює забарвлений продукт конденсації біс-2-триптофанілметан, який окиснюється до біс-2-триптофанілкарбіноду:



За наявності мінеральних кислот біс-2-триптофанілкарбінол утворює солі, забарвлені у синьо-фіолетовий колір.

Матеріали та реактиви. Водний 0,01%-й розчин триптофану, водний 2,5%-й розчин формальдегіду, концентрована сірчана кислота, 0,5%-й розчин нітрату натрію.

Обладнання. Скляні палички, пробірки градуйовані, піпетки, крапельниці, штатив для пробірок, годинник, ванночка з льодом.

Хід роботи. В пробірку вносять 2 мл 1%-го розчину яєчного білка, одну краплю 2,5%-го розчину формальдегіду. До одержаної суміші, ретельно перемішуючи, обережно додають по краплям 6 мл концентрованої сірчаної кислоти, охолоджуючи пробірку у ванночці з льодом. Через 10 хв у пробірку вливають, перемішуючи, десять крапель 0,5%-го розчину нітриту натрію. Спостерігається синьо-фіолетове забарвлення.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

ТЕМА III. МЕТОДИ РОЗДІЛЕННЯ БІЛКІВ

Діаліз

Теоретичне обґрунтування

Діаліз – це процес видалення низькомолекулярних речовин, який базується на здатності напівпроникних мембран пропускати низькомолекулярні речовини та йони. Розмір білкових молекул лежать у межах 1 мкм до 1 нм, отже вони у воді утворюють колоїдні розчини. Ці розчини характеризуються високої в'язкістю, здатністю розсіювати промені видимого світла, не проходять крізь напівпроникні мембрани (целофан, колоїдну плівку) або їх пори, вони не пропускають молекули білків більших за 15000-20000 Да.

Усі низькомолекулярні речовини вільно проходять через мембрану (рис. 1), розчинюються та виводяться проточною водою за межі системи для діалізу.

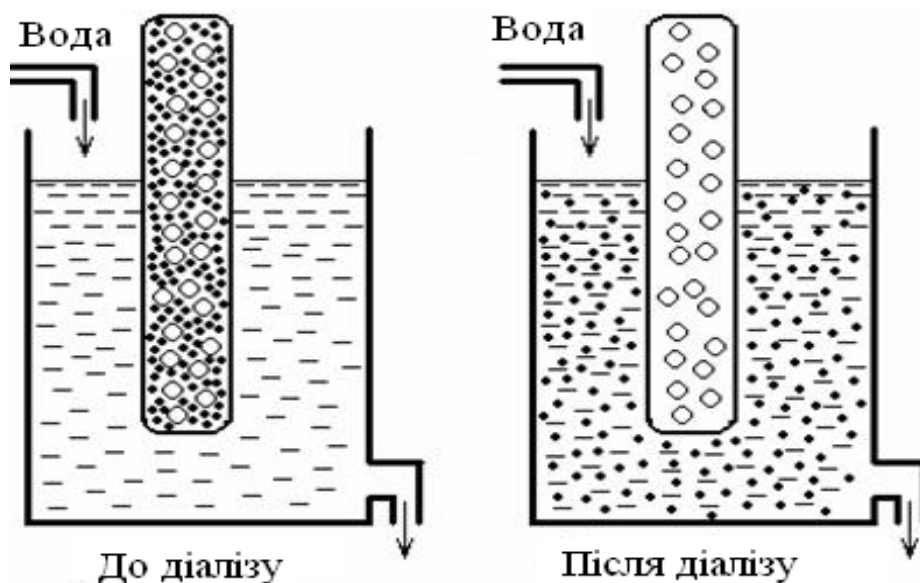


Рис.1. Діаліз (білі великі грудки – молекули білка, чорні – молекули хлористого натрію)

Непроникні для білка є всі біологічні мембрани. Цю властивість білкових розчинів широко використовують у медицині та хімії для очищення білкових препаратів від сторонніх домішок. Явище діалізу є основою дії апарату “штучна нирка”, який широко використовують у медицині на лікування гострої ниркової недостатності.

Лабораторна робота № 10. Очищення розчину білка методом діалізу.

Мета роботи. Ознайомитися з методами очищення білка шляхом діалізу.

Завдання роботи. Провести діаліз білка та дослідити в діалізаті наявність білка, хлоридів, фосфатів і глюкози.

Матеріали та реактиви.

Взяти з упаковки суху трубку для діалізу та відрізати її необхідного розміру; відрізану трубку для діалізу зволожити дистильованою водою; після зволоження трубки з одного кінця зав'язати два вузла (можна зберігати у стерильній дистильованій воді 1–2 дні); вологий діалізний мішок прокип'ятити у розчині 2%-го натрію бікарбонату (якщо планується використовувати для нуклеїнових кислот слід додати 1 мМ ЕДТА, який зв'язує солі Mg); діалізний мішок промити у дистильованій

воді (не підсушувати); підготовлений діалізний мішок можна зберігати у дистильованій воді не більше 4 годин.

Хід роботи.

В діалізатор вносять 5-10 мл розчину білка і ставлять у склянку з дистильованою водою на 50-60 хв. Після цього діалізатор виймають з води, а з водою виконують:

а) біуретову пробу на виявлення білка (1-2 мл діалізату змішують з 1-2 мл 10% розчину натрій гідроксиду і додають 1-2 краплі 1% розчину купрум (II) сульфату).

б) пробу на наявність хлоридів (до підкисленого нітратною кислотою 1-2 мл діалізату додають 1-2 краплі 1% розчину аргентум нітрату).

в) пробу на наявність фосфатів (до підкисленого нітратною кислотою 1-2 мл діалізату додають 8-10 крапель розчину амоній молібдату і підігрівують).

г) пробу Тромера на наявність глюкози (до 2-3 мл діалізату додають 0,5-1,0 мл 10% розчину натрій гідроксиду і 1-2 краплі 10% розчину купрум (II) сульфату. Повільно нагрівають).

Результати досліджень записують та роблять висновок.

Лабораторна робота № 11.

Фракціонування нативної сироватки насиченим розчином амонію сульфату

Мета роботи. Ознайомитися з методами фракціонування білків сироватки крові.

Завдання роботи. Провести діаліз сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) та перевірити повноту діалізу за допомогою розчину барію хлористого.

Матеріали та реактиви. (див. у матеріали та реактиви лабораторної роботи №5)

Хід роботи.

1.Осадження сироватки крові слід проводити на холоді за 0°C (у чашці з льодом). До 10 мл свіжо одержаної сироватки ВРХ у центрифужній пробірці (загальний об'єм 25 мл) додати по краплях 5 мл

насиченого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Після додавання кожних 0,5 мл реактиву пробірку ретельно струшують. Осад повинен зникати, поки об'єм реактиву не досягне 3 мл.

2. Після повного внесення реактиву матеріал залишити на 12 годин при $+4^\circ\text{C}$.

3. Осаджений матеріал у пробірці слід піддати центрифугуванню за 3000 об/хв. 20 хв.

4. Супернатант (надосадна рідина) відсмоктують піпеткою та видаляють.

5. До осаду додають розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 33% насичення, розмішують.

6. Одержаний матеріал слід піддати центрифугуванню за 3000 об/хв. 20 хв.

7. Супернатант (надосадна рідина) відсмоктується піпеткою та видаляється

8. Осад суспендують у 3 мл 0,9%-го розчину NaCl .

9. Матеріал вносять у підготовлений діалізний мішок. З цією метою у відкритий кінець мішка для діалізу вставляють скляну лійку, через яку в мішок наливають досліджуваний розчин.

10. Діалізний мішок з досліджуваним розчином зав'язують бавовняною білою ниткою. У мішку слід залишити вільний простір з розрахунку на збільшення об'єму, якщо концентрація розчинених у зразку речовин висока. Якщо цього не зробити при збільшенні об'єму розчину тиск всередині мішка сильно виросте і мішок розтягнеться. Це може призвести до розриву мембрани або витіканню розчину через вузли.

11. Діалізний мішок з досліджуваним розчином поміщають у плоскодонну колбу з буферним розчином (кількість розчину розраховується із співвідношення досліджуваний розчин/буфер для діалізу як 1:10000). Колбу поміщають на магнітну мішалку на середні оберти, щоб не утворювалося піни під час перемішування (ознака денатурації білка). Загальний час діалізу становить 48 годин.

12. Через 12 годин буфер у колбі обережно замінюють. Проводять діаліз 12 год за $+4^\circ\text{C}$.

13. Після закінчення діалізу вміст мішка обережно виливають у пробірку. Перевіряють повноту діалізу за допомогою розчину барію хлористого. З цією метою в окремому пробірці до невеликої кількості діалізату додають 1 М розчин BaCl_2 (у випадку неповного очищення досліджуваного розчину під дією амонію сульфату випадає осад BaSO_4).

Лабораторна робота № 12.

Фракційне осадження білків методом висолювання

Молекули білків є гідрофільними колоїдами. Білкові розчини, як і інші колоїдні системи, характеризуються порівняною нестійкістю – під впливом різних факторів вони легко можуть випадати в осад (детальніше про способи осадження білків див. підрозділ 2.10).

Стійкість білкових розчинів залежить від наявності електричного заряду і гідратної оболонки на поверхні білкових молекул. Відповідно, при знятті гідратної оболонки (дегідратації) та при втраті заряду білки легко коагулюють і випадають у осад. Оборотно осадження білків концентрованими розчинами нейтральних солей (сульфатом амонію, хлоридом натрію) називають висолюванням.

При додаванні до розчинів білків солей лужних і лужноземельних металів аніони (SO_4^{2-}) і катіони солі (Na^+ , NH_4^+) взаємодіють із позитивно і негативно зарядженими групами у радикалах амінокислот, через що щезає заряд і взаємовідштовхування молекул. Одночасно різко зменшується гідратна оболонка навколо білка. Як наслідок, білкові молекули злипаються і випадають в осад.

Різні білки різняться за амінокислотним складом, розміром і зарядом – тому можна підібрати такі концентрації солі, які осадять менш стійкі білки, поки інші ще будуть у розчині. Першими розчиняються білки із меншим зарядом (треба менше солі, щоб нейтралізувати їх заряд). Так, глобуліни плазми крові осаджуються за 50%-вого насичення розчину нейтральними солями, тоді як альбуміни (більш полярні молекули) – при 100%-вому насиченні сіллю. Крім того, глобуліни – великі й важкі молекули із невеликою водною оболонкою, у той час як альбуміни – менші й оточені великою водною оболонкою. Чим менша гідратна оболонка навколо білка, тим менше потрібно солі для її руйнування і, отже, і для осадження.

Процес висолювання є оберненим – після видалення солі (діаліз, розведення) білок знову набуває природних властивостей. Фракціонування білків методом висолювання використовують у клінічній практиці для одержання нативних білків з біологічних рідин.

Матеріали та реактиви. Розчин сироватки крові, насичений розчин сульфату амонію. Обладнання. Лійки, фільтри, пробірки, піпетки, пальник або водяна баня.

Хід роботи. У пробірку вливають 2-3 мл сироватки крові, додають рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію, перемішують. В осад випадають глобуліни (50%-ве насичення розчину), які мають відносно велику молекулярну масу і невеликий заряд. Осад відфільтровують. До осаду на фільтрі додають невелику кількість води, в отриманому розчині містяться глобуліни, наявність яких виявляють шляхом кип'ятіння, спостерігаючи утворення осаду.

Фільтрат з розчином альбумінів розливають у 2 пробірки. У першу додають кристалічний сульфат амонію до повного насичення (100%-ве насичення розчину). В осад випадають альбуміни. Вміст другої пробірки кип'ятять, спостерігають утворення осаду білків альбумінів.

Результати дослідження оформлюють у вигляді таблиці (табл. 2.10).

Таблиця 3. Результати фракційного розділення білків сироватки крові методом висолювання

Назва білкової фракції	Сіль, яку використовують	Ступінь насичення	Утворення осаду
Глобуліни			
Альбуміни			

У висновку пояснюють отримані результати.

ТЕМА IV. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ ФРАКЦІОНУВАННЯ БІОМОЛЕКУЛ

Теоретичне обґрунтування

Розділення білків проводять шляхом осадження у розчині або шляхом адсорбції. Серед лабораторних методів очистки, фракціонування та аналізу структури білків, нуклеїнових кислот та їх компонентів важливе місце займають методи хроматографічних досліджень. Жоден інший метод не може порівнятися з хроматографією за широтою кількісного діапазону. Починаючи з препаративних колонок об'ємом у декілька літрів (на них можна вести фракціонування препарату кількістю декілька грамів) до мікроаналізу амінокислотного складу білка, коли на колонку вносять соті долі мікрограма гідролізату.

Хроматографія – високоефективний фізико-хімічний метод розділення і аналізу, в якому речовина розподіляється між двома фазами: рухомою та нерухомою. Перша робота (1903) в цій галузі належить українському вченому М.С.Цвіту. Він розділив хлорофіл на складові частини і виявив речовини, що входять до складу хлорофілу, використавши для цього колонку, наповнену карбонатом кальцію.

Одним з найпростіших видів хроматографії, що не потребує складної апаратури, вважається хроматографія на папері, або паперова хроматографія. Залежно від техніки експерименту паперова хроматографія розподіляється на: 1) висхідну; 2) низхідну; 3) двомірну та 4) кругову, рис 2.

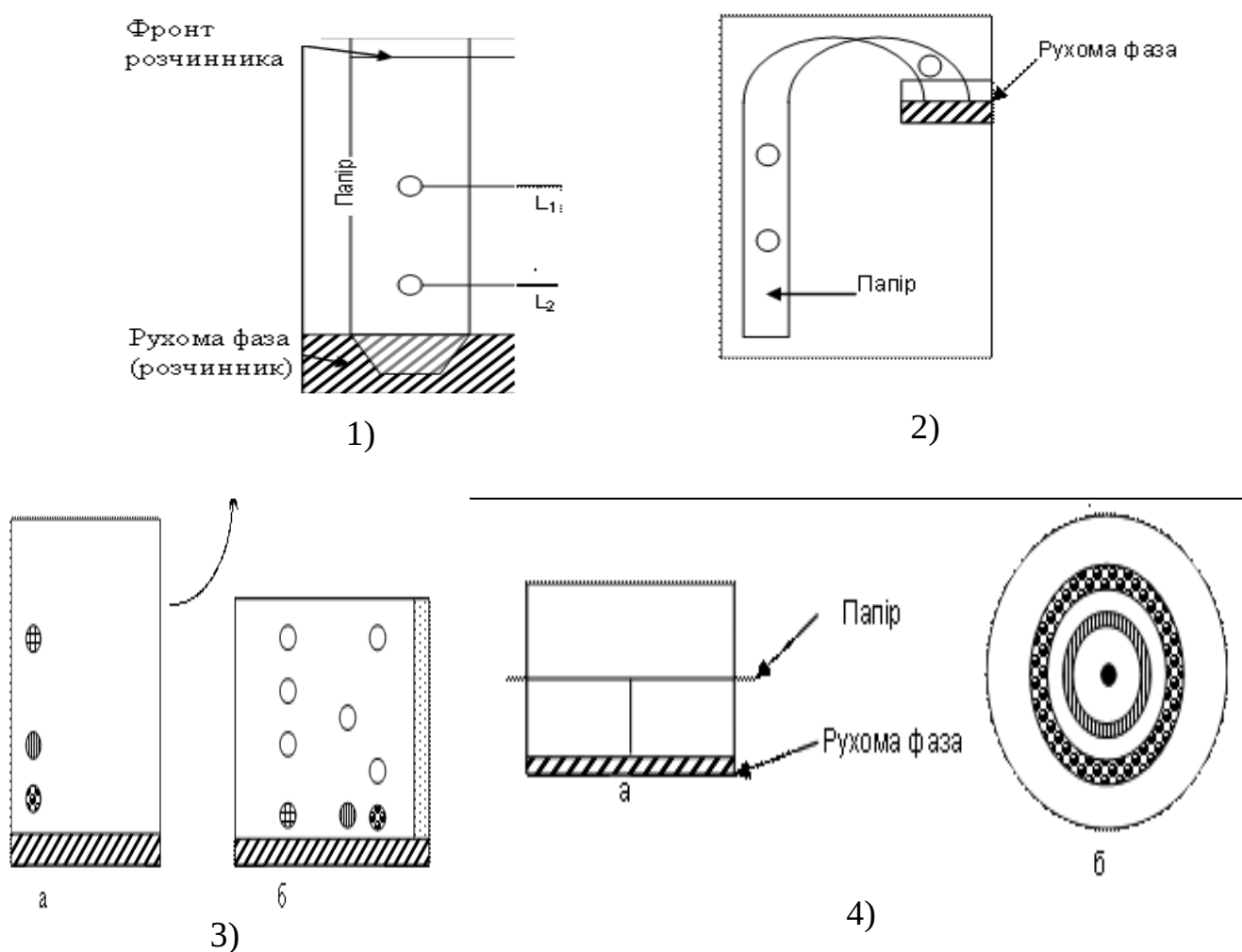


Рис.2. Висхідна паперова хроматографія (1), низхідна хроматографія (2), двомірна паперова хроматографія: а) попередній розподіл; б) остаточний розподіл (3), кругова хроматографія: а) вигляд приладу збоку; б) вигляд хроматограми зверху (4).

Хроматографія базується на тому, що розчинені речовини відстають від фронту розчинника по мірі його проходження по носію. Для проведення хроматографії можна використовувати колонки з носіями. По мірі проходження розчинника по колонці, речовини, які є у зразку, розподіляються залежно від ступеня розчинення.

Речовини повністю виділені розчинником, рухаються разом з фронтом розчинника ($R_f=1$) і вимиваються першими. Речовини, які повністю адсорбувалися носієм ($R_f=0$) залишаються на старті. Хроматографія можлива лише при умові $0 \leq R_f \leq 1$, коли речовина затримується в результаті часткової адсорбції, але пізніше обов'язково елююється (виділяється).

Хроматографічні методи об'єднує в одну категорію одна принципова особливість – у будь-яких підходах можна виявити двофазну систему, у якій одна фаза не рухома, а інша переміщується відносно неї з деякою швидкістю в одному визначеному напрямку. Не рухома фаза залишається незмінною, заповнюючи порожнину трубки (хроматографічної колонки) або фіксуючись на поверхні скляної чи пластикової пластинки (інколи її основу утворює фільтрувальний папір або плівка ацетилцелюлози).

Рухома фаза безперервно оновлюється, вона надходить у систему з одного кінця і залишає її з іншого. Молекули компонентів висхідної суміші речовин розподіляються між двома фазами відповідно до ступенів їх спорідненості до них. На кожній ділянці нерухомої фази цей розподіл намагається досягти динамічної рівноваги, яка безперервно порушується внаслідок переміщення рухомої фази.

У результаті постійного перерозподілу, молекул речовини між фазами мігрують у напрямку руху рухомої фази. Розподіл між фазами проходить незалежно для кожного компоненту суміші речовин. Якщо спорідненість молекул компонентів суміші до двох фаз не однакова, тоді ці молекули мігрують у напрямку рухливої фази – впродовж шляху хроматографічного розподілу (впродовж колонки) з різною швидкістю, що дозволяє фізично відокремити ці компоненти.

Для очистки та фракціонування білків використовується переважно рідинна хроматографія. Варіанти рідинної хроматографії різняться за природою споріднення молекул, які фракціонуються до хроматографічних фаз, тому хроматографію класифікують за принципом фракціонування (гель-фільтрація, розподільча хроматографія, адсорбційна хроматографія, афінна хроматографія, йонообмінна хроматографія).

Лабораторна робота № 13.

Розділення білків та суміші амінокислот методом паперової хроматографії

Мета роботи. Ознайомитися з різними методами хроматографії розділення білків та суміші амінокислот.

Завдання роботи. Оволодіти технікою паперової хроматографії, методами хроматографічного розподілу суміші речовин на колонці з оксидом алюмінію або силікагелем; суміші амінокислот методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol та методом очищення γ -глобуліна за допомогою колонкової йонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі

3.1. Техніка хроматографії на папері або у тонкому шарі.

Хід роботи. Розчин органічної речовини тонким капіляром наносять у певній точці від краю паперу (пластинки), яку відмічають як точку або лінію старту. Просушують папір (пластинку) і вносять у посудину з тонким шаром елюенту. Під час руху елюенту по нерухомій фазі відбувається розподіл компонентів суміші. Не допускаючи виходу елюенту на край паперу (пластинки), виймають, відмічають кінець руху рухової фази (фінішну лінію), сушать та розглядають під ультрафіолетовим промінням або, за необхідності люмінесцентним (у разі відсутності кольору органічної речовини), проявляють, зрошуючи розчинами реагентів, концентрованою сульфатною кислотою чи вносять на декілька секунд у пари йоду (закритий посуд із кристаликами йоду на дні).

Положення плям речовин по закінченні хроматографії характеризується значеннями R_f (Ratio of fronts – відношення фронтів):

$$R_f = L:L S,$$

де L – відстань від лінії (точки) старту речовини до середини плями після хроматографії та проявлення, а $L S$ – відстань, яку пройшов фронт розчинника від лінії старту до фінішної лінії. Незважаючи на той факт, що R_f суттєво залежить від підібраної пари рухомої та нерухомої фази, температури та ін., якщо стандартизувати умови підготовки та проведення хроматографії речовини, то R_f – характеристична величина для даної речовини. Тому цю величину досить часто наводять як довідкову з метою ідентифікації. Хроматографія невідомої речовини часто проводять з паралельним нанесенням сполуки відомої будови зі

встановленим значенням R_f (сполука - свідок) – з метою коригування R_f до стандартних умов. Хроматографія реакційних сумішей виконують зі свідками – вихідними реагентами.

3.2. Хроматографічний розподіл суміші речовин на колонці з оксидом алюмінію або силікагелем.

Хід роботи. У колонку одноразово наливають суспензію сорбенту у вибраному для хроматографії елюенті. Дають осісти частинкам сорбенту (для більш щільного осідання нерухомої фази постукують по колонці паличкою). Потім відкривають кран для витікання зайвого розчинника. Рідина повинна витікати з колонки зі швидкістю 1–2 краплі в секунду. Коли рівень елюенту досягне верхнього тампону, у колонку вливають насичений розчин суміші речовин, які необхідно розділити (рис 3).

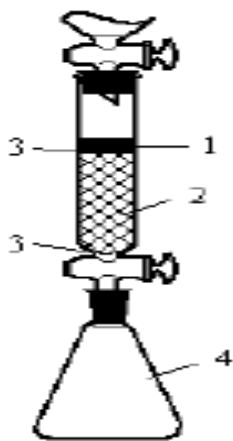


Рис. 3. Прилад для колонкової хроматографії 1–розчинник (елюент); 2 – сорбент; 3 – верхній та нижній тампони; 4 – приймач.

Речовини фіксуються на сорбенті у верхній частині колонки; потім, по мірі витікання елюенту, у колонці створюються забарвлені зони, в яких сконцентровані речовини, які розділяють (для безколірних, але люмінесцентних речовин з метою контролю за зонами використовують ультрафіолетового проміння). Коли рівень елюенту опуститься до верхнього тампону, у колонку доливають невеликими порціями (по 5–10 мл) чистий елюент (бажано використовувати прилад для дозованого додавання розчинника, наприклад, бюретку).

Після того як забарвлений розчин першої речовини перейде у приймач, а із колонки почне витікати чистий елюент, приймач замінюють і хроматографії продовжують з метою виділення іншої речовини, яка утворила другу зону. З метою прискорення хроматографії та економії елюенту можна замінити його на більш активний, але сумісний з першим. Заміну елюенту проводять коли рівень першого елюенту опуститься до верхнього тампону і потім продовжують промивати останнім розчинником. Новий елюент збирають в окремий приймач. Розхід елюентів залежить від будови органічних речовин, які розділяють, від активності сорбенту тощо. Розчини із приймачів випарюють до сухого

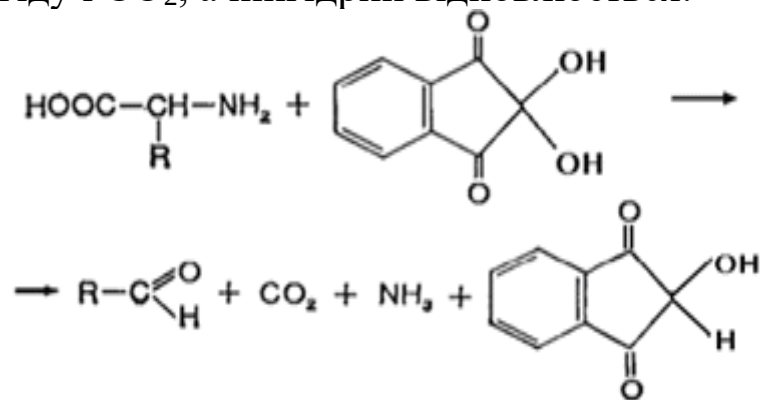
залишку, визначають масу виділених речовин або інші фізико-хімічні характеристики речовин.

3.3. Розділення суміші амінокислот методом тонкошарової хроматографії на пластинках *Silufol*

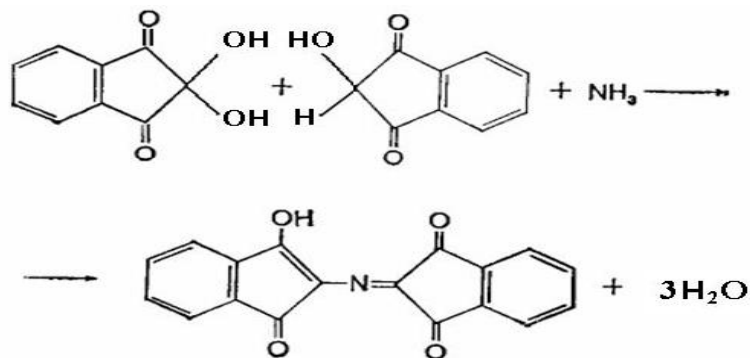
Принцип методу.

Метод засновано на різному коефіцієнті розподілу амінокислот між рухомою гідрофобною фазою (розчинник на основі *n*-бутанолу) та нерухомою гідрофільною фазою – водою, яка диспергована на пористому носіїві *Silufol*, що тонким шаром розподілений на пластинці. Розчинник, пересуваючись по шару за рахунок капілярних сил, з різними швидкостями (залежно від полярності радикалу амінокислоти) переміщує компоненти суміші амінокислот на різні відстані. Положення амінокислот на пластинці виявляють за допомогою нінгідринової реакції.

В результаті взаємодії α -амінокислоти з нінгідрином утворюється забарвлена комплексна сполука. Під час нагрівання (до 70°C) α -амінокислоти окиснюються нінгідрином та піддаються окисному дезамінуванню з утворенням амоніаку та декарбоксилюванню з утворенням альдегіду і CO₂, а нінгідрин відновлюється:



Відновлений нінгідрин, що конденсується з амоніаком і окисненим нінгідрином, утворює сполуку, яка, енолізуючись, переходить у забарвлену форму синьо-фіолетового кольору:



При взаємодії з певними розчинниками, на яких готують розчин нінгідрину, радикал амінокислоти може зумовлювати різне забарвлення (червоне, жовте, блакитне). Реакція з нінгідрином є специфічною для амінокислот, що містять α -аміногрупу. У реакції гліцину з нінгідрином утворюється комплексна сполука синьо-фіолетового забарвлення.

Амінокислоти в суміші ідентифікують за розподілом відомих амінокислот (стандартів), порівнюючи значення коефіцієнту розподілу **Rf**, який визначається як співвідношення відстаней, що пройшла амінокислота та рухома фаза від точки старту, що є характерною величиною для кожної амінокислоти за певних умов дослідів (склад розчинника, температура, тип носія на пластинці).

Матеріали та реактиви.

Пластинки **Silufol**, розчинник – суміш н-гексану, ефіру та ацетатної кислоти (80:20:1), нінгідриновий реактив (95 мл 0,5% розчину нінгідрину в 95% ацетоні), суміш амінокислот та їх стандартні розчини (0,1% розчини гліцину, лейцину та глютамінової кислоти, виготовлені на 10% ізопропіловому спирті, підкисленому соляною кислотою, 1 мл льодяної ацетатної кислоти та 4 мл дистильованої води).

Обладнання.

Хроматографічна камера, пластинки, піпетки, дозатори, сушильна шафа, склограф, лінійка, пальник.

Хід роботи.

На вертикально розташованій пластинці, не пошкоджуючи сорбент, на відстані 1,5-2,0 см від нижнього краю відмічають склографом лінію старту. На однаковій відстані один від одного наносять на лінію стандартні розчини амінокислот та розчин, що містить суміш амінокислот, по 20 мкл. Діаметр плям не повинен перевищувати 3-4 мм, тому кожен пробую наносять у кілька прийомів. Висушують пластинку до зникнення плям, після чого її вертикально розташовують у хроматографічній камері, в якій міститься розчинник і нінгідриновий реактив, занурюючи нижній край пластинки у розчинник на 0,5-1,0 см. Хроматографію припиняють, коли фронт розчинника досягне рівня не менше 10 см (приблизно 1 год хроматографії).

Після хроматографії пластинку висушують та проявляють, дуже обережно нагріваючи пластинку над пальником.

Обробка результатів.

Порівнюючи положення плям суміші амінокислот та амінокислот-свідків, амінокислоти ідентифікують. Визначивши за допомогою лінійки відстань, пройдену розчинником та кожною з амінокислот-свідків та амінокислот суміші, обчислюють коефіцієнт розподілу ***Rf*** для амінокислот-свідків та амінокислот суміші і порівнюють між собою (рис. 4). Дані заносять у таблицю 2.

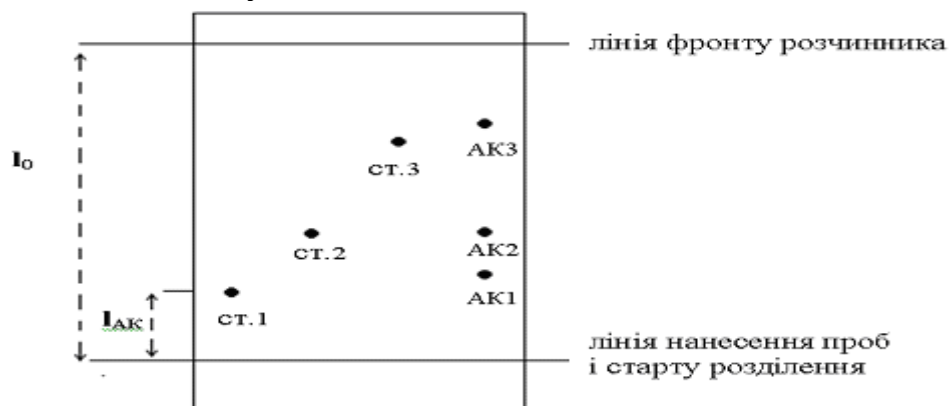


Рис. 4. Схематичне зображення розподілу амінокислот (плями) на хроматографічній пластинці. l_{AK} – відстань, пройдена амінокислотою від лінії нанесення проб. l_0 – відстань, пройдена розчинником від лінії нанесення проб. ст.1, ст.2, ст.3 – амінокислоти-свідки, AK1, AK2, AK3 – амінокислоти суміші.

Значення ***Rf*** для амінокислот-стандартів розраховують за формулою:

$$Rf = LCT/L_0$$

а для амінокислот суміші за формулою:

$$Rf = LAK/L_0$$

Таблиця 4. Показники хроматографічного розділення амінокислот для визначення амінокислотного складу суміші

Нанесений зразок	l_{cm}	l_{ak}	l_0	Rf	Амінокислоти у зразку
1-й стандарт					
2-й стандарт					
3-й стандарт					
Суміш амінокислот					1. 2. 3.

3.4. Очищення γ -глобуліна за допомогою колонкової йонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі

Хід роботи.

1. Підготовка йонообмінника. Залити 50,0 г порошку ДЕАЕ-целюлози (диетиламіноетилцелюлози) 1000 мл дистильованої води для набухання. Після того як більша частина порошку посяде, відсмоктати надосадову рідину з неосадженими частками порошку (вони забивають колонку та різко знижують швидкість протікання розчинника). Осад знову підіймають у дистильованій воді та після осадження декантують.

2. Підготовка колонки. Якщо не має справжньої колонки, взяти скляний або пластмасовий медичний шприц на 20 мл. Виміряти розмір колонки (h - висота, d - діаметр, V - об'єм).

2.1. Закріпити колонку вертикально на штативі.

2.2. На дно колонки помістити диск з паперу завтовшки 3 мм (ватман)

2.3. Заповнити колонку йонообмінником – ДЕАЕ-целюлозою. Для цього целюлозу у склянці промити H_2O dest. та заповнити колонку при постійному перемішуванні. При закритому крані колонки суспензія йонообмінника поступово осідає. Після повного осадження суспензії з метою ущільнення йонообмінника через колонку слід пропустити 100 мл буфера.

2.4. Після заповнення колонки на поверхню сорбенту викласти паперовий диск (див. пункт 2.2.)

2.5. Урівноважуємо колонку. Пропускаємо 0,5 М NaOH. Вихід NaOH контролюємо індикаторним папером. Для визначення об'єму NaOH, необхідного для активації колонки, слід зробити розрахунки за формулою:

$S = \pi r^2 \times 2h$ де, π – 3,14, r – внутрішній радіус колонки, h – висота йоннообмінника, наприклад:

$S = 3,14 \times 0,752^2 \times 19,5 = 35$ мл – це один об'єм NaOH.

2.6. Після проходження 1-2 об'єму NaOH, колонку промивають H_2O dest. до pH 8,0-8,5.

2.7. Пропускають 1-2 об'єми 0,5 М HCl, після чого промивають H_2O dest. до pH 6,0.

2.8. Пропускають через колонку 3-4 об'єми 0,02 М фосфатного буфера, pH 6,35. Швидкість протікання 10-15 крапель/хв.

3. Проведення колонкової хроматографії (рис.5).

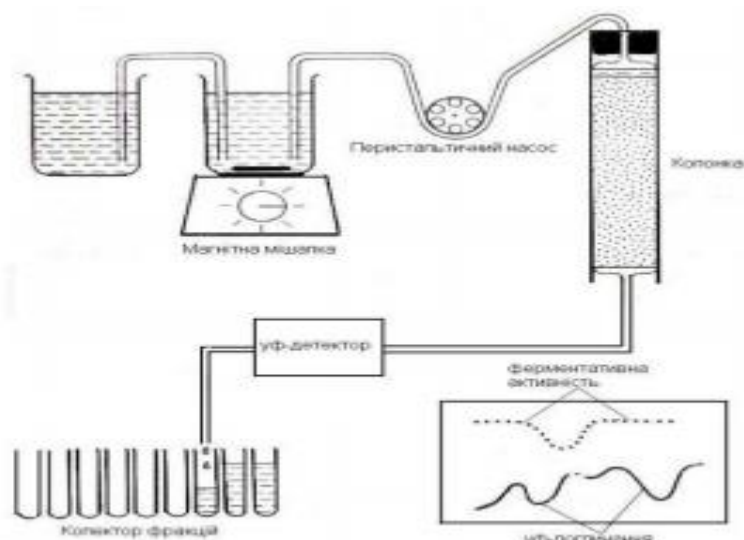


Рис. 5. Схема системи колонкової хроматографії.

3.1. Повністю відсмоктують буфер з поверхні іонообмінника у колонці. Досліджуваний матеріал (сироватка крові кроля оброблена $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ після діалізу) вносять у колонку з ДЕАЕ-целюлозою. Білок нашаровують обережно та дають йому всмокнутися.

3.2. Пропускають через колонку 0,02 М фосфатний буфер, рН 6,35 зі швидкістю протікання 10–15 крапель/хв.

3.3. Елюат збирають у флакони по 5 мл. Хроматографію білків слід проводити на холоді (+4+6°C).

3.4. Концентрацію білка у фракціях визначають за допомогою спектрофотометра (за поглинанням при 280 ммк) або безперервно на приладі типу Uvicord.

3.5. Після закінчення хроматографії матеріалу перекривають кран колонки.

3.6. Іонообмінні целюлози можуть бути використані багаторазово.

З цією метою після кожного експерименту іонообмінник треба регенерувати – пропустити через колонку 0,5 М NaOH, що забезпечує практично повне видалення зв'язаного з іонообмінником білка. Після чого целюлозу промивають дистильованою водою до повного видалення лугу. Після урівноваження ДЕАЕ-целюлози відповідним буфером вона може бути використана вдруге. З часом емність іонообмінників знижується внаслідок руйнування частини іоногенних груп. Тому регенерацію можна проводити не більше 6-8 разів.

ТЕМА IV. ФРАКЦІОНУВАННЯ БІЛКІВ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Теоретичне обґрунтування

Гель-електрофорез – один із стандартних молекулярно-біологічних методів аналізу. Він дозволяє розділяти в рідинах, з використанням певних носіїв, молекул, які різняться між собою за величиною електричного заряду, просторовою конфігурацією, молекулярною масою (розмірами). В експериментальних дослідженнях електрофорез використовується для розділення різних молекул із метою ідентифікації та кількісного їх визначення, а також встановлення молекулярної маси. Розділяють білки, переважно, в поліакриламідних гелях (ПААГ), які є найрозповсюдженішими в експериментальних дослідженнях завдяки наступним характеристикам:

- розмір пор в цих гелях можна змінювати в широких межах;
- їх можна використовувати з найрізноманітнішими буферами;
- в них дуже низькі адсорбція та електроосмос;
- розподіл проходить швидко з високим розділенням.

Гелі отримують за полімеризації акриламідів ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), як правило, з N,N'-метилендіакриламідом в присутності каталізатора (0,1-0,3% персульфату амонію, 0,1-0,3% β -диметиламінопропіонітрилу та ін.). Поліакриламідні гелі готують із загальним вмістом акриламідів від 3% (пори мають діаметр 0,5 нм) до 30% (пори – 0,2 нм). Електрофорез у поліакриламідному гелі проводять у колонках (вертикальних трубочках) або на пластинках.

Для запобігання агрегації білків у розчин препарату і буферу вносять сечовину в концентрації 2,0–8,0 М. У концентрованих розчинах сечовини виникає денатурація білків (порушується вторинна і третинна структури). Як правило, така денатурація зворотна, але ступінь і зворотність денатурації залежить від природи білка і концентрації сечовини.

Для визначення молекулярної маси білків широко використовують електрофорез у поліакриламідному гелі з детергентом додецилсульфатом натрію (ДДС-Na) за Лемлі. За рахунок гідрофобних взаємодій детергент майже однаково зв'язується з більшістю білків і робить несуттєвою роль заряду самого білка. Електрофорез у присутності ДДС-Na дозволяє розділити білки залежно від молекулярної маси.

Лабораторна робота № 14

Електрофорез білків у поліакриламідному гелі

Мета роботи. Ознайомитися з методом електрофорезу білків у поліакриламідному гелі.

Завдання роботи. Оволодіти технікою електрофорезу білків у поліакриламідному гелі (приготування розчинів і заливка ПААГ, підготовка камери для електрофорезу, проведення електрофорезу білків, фарбування білків Coomassie R-250).

4.1. Приготування розчинів і заливка ПААГ. Підготовка до електрофорезу білків порівняно з електрофорезом ДНК займає більше часу. Концентруючий гель зазвичай має концентрацію акриламіду від 2 до 8% і значення рН 6,8. Розділюючий гель має концентрацію акриламіду від 5 до 20% і рН в межах 8,5-8,9. Вибір щільності гелю залежить від молекулярних мас досліджуваних білків. Як буфер найчастіше використовують Tris-гліциновий або Tris-боратний буфер з рН середовища 8,0-9,0.

Матеріали та обладнання.

Апарат для вертикального електрофорезу, джерело постійного струму, скляні пластини з вирізом і без вирізу, гребінка, спейсери, шприц для нанесення зразків, реактиви для приготування ПААГ і буферів.

1. Електроодний буфер (200 мл).

Tris-ОН (трис(гідроксиметил)аміном етан) – 3,03 г, гліцин – 14,44 г, SDS (додецилсульфат натрію) 2,0 г, H₂O (бідистильована, деіонізована, тут і далі) до 200 мл.

2. Розчин АА/диАА

АА (акриламід) – 30 г, диАА (N,N'-метилендіакриламід) – 0,8 г, H₂O до 100 мл.

3. Буфер 1 (для концентруючого гелю).

Tris-HCl (трис-гідрохлорид) – 6,06 г, SDS – 0,4 г, H₂O до 100 мл, рН 6,8, титрувати 4-6 N HCl перед додаванням SDS.

4. Буфер 2 (для концентруючого гелю).

Tris-HCl (трис-гідроксиметил)амінометан) – 18,17 г, SDS – 0,4 г, H₂O до 100 мл, рН 8,8, титрувати 4-6 N HCl, перед додаванням SDS.

5. БФС (бромфеноловий синій) – 2 г, H₂O до 4 мл.

6. Барвник (0,125% кумасі R-250) – 1,25 мг, етанол – 5 мл, 10% ацетатна кислота – 1 мл, H₂O до 10 мл.

7. Відмиваючий розчин 1 (50% етанолу, 10% ацетатна кислота), ацетатна кислота (10%) – 10 мл, етанол (50%) – 50 мл, H₂O до 100 мл. Перед використанням розбавити у 5 разів.

8. Відмиваючий розчин II (5% етанол, 10% ацетатна кислота), ацетатна кислота (10%) – 35 мл, етанол (50%) – 25 мл, H₂O до 100 мл. Перед використанням розбавити у 5 разів.

Буфер для зразків.

Гліцин 15% - 7,5 мл, β-меркаптоетанол – 2,5 мл, SDS – 1,15 г, Тріс-НСІ (тріс-гідрохлорид) – 0,38 г, H₂O, рН 6,8 до 25 мл. 10% ТХА (три хлорацетатна кислота), 5% ПСА (персульфатамонію), ТЕМЕД (N,N,N,N-тетраметилетилендіамін).

Методика

Підготовка скляних колб для заливки поліакриламідного гелю

1. Взяти скло з вирізом і помістити його по бічних краях спейсера.

2. Зверху покласти на спейсери скло без вирізу. Обережно поставити зібрану конструкцію вертикально в камеру так, щоб можна було залити гель у порожнину між склом. Закріпити конструкцію затискачами.

3. Розплавити 3% агару, охолодити до 50-60°C і залити тонким шаром (5 мм) дно електрофорезного осередку щоб уникнути протікання гелевого розчину.

Заливка гелю

1. Для приготування розділюючого гелю змішати компоненти А (за винятком ТЕМЕД і ПСА) у відповідності з даними, приведеними в табл. 4 (для різних об'ємів). Отриману суміш ретельно перемішати.

Таблиця 5. Підготовка розділюючого гелю

Компонент	3%	6%	10%	20%
Розчин АА/диАА	1,0 мл	3,0 мл	4,95 мл	13,34 мл
Буфер 2	2,5 мл	3,75 мл	3,75 мл	5,0 мл
H ₂ O	6,5 мл	8,25 мл	6,3 мл	1,66 мл
ТЕМЕД	10,0 мкл	15,0 мкл	15,0 мкл	40,0 мкл
ПСА, 5%	30,0 мкл	45,0 мкл	45,0 мкл	120,0 мкл
V загальний	10,0 мл	15,0 мл	15,0 мл	20,0 мл

2. Додати послідовно ТЕМЕД і ПСА і ретельно перемішати отриманий розчин, при цьому важливо, щоб у процесі перемішування не утворювалися бульбашки.

3. Отриманий розчин розділяючого гелю акуратно залити між скляними пластинами так, щоб рівень не перевищував 3 см від верхнього краю пластин.

4. Обережно нашарувати на розчин розділяючого гелю тонкий шар метанолу або деіонізованої води і залишити гель застигати (до 20 хв).

5. Приготувати розчин концентруючого гелю як зазначено в табл. 5.

6. Видалити шар метанолу або води з поверхні застиглого розділяючого гелю фільтрувальною папером.

7. Нашарувати на поверхню застиглого розділяючого гелю розчин концентруючого гелю, і негайно після цього вставити гребінку між скляними пластинами.

Таблиця 6. Підготовка концентруючого гелю

Компонент	6%	10%
Розчин АА/диАА	2,0 мл	3,3 мл
Буфер 1	2,5 мл	2,5 мл
H ₂ O	5,5 мл	4,2 мл
ТЕМЕД	20,0 мкл	10,0 мкл
ПСА, 5%	60,0 мкл	30,0 мкл
V загальний	10,0 мл	10,0 мл

8. Залишити гель застигати впродовж 20 хв. Відлити біля 1,7 мл із залишків гелевого розчину в пробірку і використовувати цей розчин як індикатор полімеризації.

Підготовка камери для електрофорезу.

1. Помістити електрофорезну камеру на рівну горизонтальну поверхню. Залити електродний буфер у верхню ємкість камери так, щоб рівень буфера був на 0,5 см вище рівня гелю.

2. Залити електродний буфер у нижній піддон камери.

3. Обережно видалити гребінку і промити лунки електрофорезним буфером за допомогою шприца або мікропіпетки.

Примітка:

а) готовий розчин для гелю необхідної концентрації без ТЕМЕД і ПСА можна зберігати в холодильнику близько року. Акриламід токсичний, працювати з ним необхідно в рукавичках;

б) у 15% ПАА-гелях ефективно розділяються білки з діапазоном молекулярних мас 10-45 kDa, в 10% гелях – 14-205 kDa, в 7,5% – 24-205 kDa, в 5% – 36-205 kDa;

в) готові гелі можна зберігати в холодильнику не виймаючи гребінки. Однак розділюючий та концентруючий гель мають різні буфери, тому краще, залитий гель використовувати відразу.

4.2. Проведення електрофорезу білків.

Електрофорез проводять зазвичай за нейтрального або слабо-лужного середовища, коли більшість білків мігрує до аноду. За проходженням електрофорезу стежать за рухом барвника бромфенолового синього (БФС).

Матеріали та обладнання

Електрофорезна камера з гелем, джерело струму, зразки білків для аналізу, маркери молекулярної маси. Розчини:

- 2 буфер для нанесення зразків (робота 4.1).
- Розчин БФС (робота 4.1).

Хід роботи.

1. Для того, щоб підготувати зразки так, щоб загальна концентрація білка була не більша 10 мг/мл потрібно 10 мкл зразка розбавити буфером (2) для нанесення зразків, додати 4 мкл розчину БФС. Зразки рекомендується прокип'ятити впродовж 5 хв.

2. За допомогою гамільтонівського шприцу або мікропіпетки-дозатора з витягнутим наконечником відміряти по 10 мкл зразків у лунки гелю.

3. Підключити електрофорезну камеру до джерела струму, дотримуючись полярності.

4. Провести електрофоретичний розподіл білків при постійному струмі 20 мА, 60 В для одного гелю і 60 мА, 150 В для іншого гелю. Підвищувати напругу треба при проходженні БФС до розділюючого гелю. У цих умовах електрофорез триває 40-50 хв.

5. По досягненню барвником нижнього краю гелю відключити струм.

6. Вийняти пластину з гелем із електрофорезної камери.

7. Обережно вийняти спейсери, що знаходяться між склом.

8. Відокремити гель та пофарбувати.

4.3. Фарбування білків Coomassie R-250

Обробка поліакриламідних гелів після електрофорезу включає фарбування та їх відмивання. Гель заливають трихлороцтовою кислотою, ретельно відмивають водою і поміщають у розчин барвника кумасі

діамантового блакитного Coomassie R-250.

Молекули барвника зв'язуються з аргініном і гідрофобними амінокислотними залишками. Зв'язана форма має синє забарвлення, тому на гелі видно смуги білка з різною інтенсивністю забарвлення, що корелює з його концентрацією.

Після фарбування білкових смуг гель необхідно відмити від незв'язаного барвника Coomassie R-250. Відмивають гелі в розчинах етанолу (або метанолу) та ацетатної кислоти.

Матеріали та обладнання

Поліакриламідний гель із результатами електрофорезу білків. Розчини: 10% ТХА (робота 4.1), розчин Кумасі R-250 (робота 4.1), відмиваючий розчин I (робота 4.1), відмиваючий розчин II (робота 4.1).

Хід роботи

1. Відразу після електрофорезу поміщають гель в ємність для відмивання, заливають 10% ТХА, залишають на 30-60 хв. Можна замінити ТХА на 5 мМ HCl.

2. Додають воду, добре промивають, зливають воду.

3. Поміщають гель у розчин кумасі для фарбування на 1,0-1,5 год.

4. Зливають розчин кумасі і розчин 1 через 1,0-1,5 год.

5. Видаляють відмитий розчин I.

6. Поміщають гель у відмиваючому розчин II і залишають на час поки із гелю не зникне забарвлення.

Примітки:

чутливість до фарбування білків на порядок зростає, коли в розчин вносять йони срібла. Після обробки гелю ацетатною кислотою і етанолом розчином I, ретельного промитий гель переносять на 30 хвилин у 5 об'ємів 0,1% розчину AgNO_3 . Потім після промивання водою, поміщають в такий же об'єм 0,28 М карбонату натрію з додаванням до 0,02% формальдегіду. Забарвлені смуги білка з'являються через кілька хвилин. Слід дочекатися найкращого контрасту і зупинити реакцію промиванням у 10% ацетатній кислоті.

ТЕМА V. ВИРОБНИЦТВО КОРМОВИХ БІЛКІВ

Теоретичне обґрунтування

Для отримання харчового білка використовують пшеницю, сою, овес, льон, соняшник, кунжут, сочевицю, горох, побічні продукти переробки зерна, зелені частини рослин, мікробну біомасу. Білоквмісні продукти ділять на три групи: білкові ізоляти (вміст сирого протеїну не менше 85%), білкові концентрати (не менше 65% сирого протеїну) та білкові продукти (не менше 30% сирого протеїну).

Білкові продукти з пшеничних висівок отримують методом лужної чи кислотної екстракції. За першим способом висівки обробляють 2%-ним водним розчином гідроксиду натрію за 50-60°C і отримують екстракт, від якого центрифугуванням або фільтруванням відокремлюють нерозчинний залишок. Екстракт центрифугують та отримують крохмаль-білковий продукт і освітлений екстракт. З освітленого екстракту при підкисленні соляною кислотою осаджують білок, який відділяють центрифугуванням від сироватки, промивають і сушать.

При отриманні білкових препаратів з побічних продуктів переробки зернових культур доцільно використання ферментних препаратів цитолітичної, пектолітичної та геміцелюлазної дії, що полегшують доступ розчинників до білка. Результатом є підвищення виходу препаратів з 9-11 до 11-14% відповідно маси сировини.

Білкові препарати з висівок містять не менше 60% білка, володіють високими функціональними властивостями та біологічною цінністю. Лімітуючою амінокислотою є ізолейцин (88%). Препарати можуть застосовуватися як поліпшувачі або збагачувачі у виробництві хлібобулочних, кондитерських, ковбасних виробів, пасти до сніданку та ін.

Основні стадії технології фракціонування листково-стеблової маси однорічних і багаторічних трав включають: подрібнення і віджимання біомаси, отримання зеленого соку, коагуляцію білків, розподіл коагульованого соку на білкову пасту і коричневий сік, згущення коричневого соку та сушка пасти. Проблема полягає в тому, що при подрібненні зелених частин рослин руйнуються стінки їх клітин. Мембрани хлоропластів також руйнуються і їх білки змішуються з білками цитоплазми, переходячи в клітинний сік. Частинки, що містять хлорофіл і продукти його розпаду, дуже стійкі до осадження, цитоплазматичні ферменти викликають гідроліз білка, а фенольні

сполуки вакуолей і пектини клітинних стінок можуть змінювати структуру білка і погіршувати колір препаратів. Тому технології включають прийоми, спрямовані на виключення необхідності очищення соку від хлорофілу, пектинів і коричневих пігментів.

Технологія виробництва соєвих білкових концентратів передбачає три способи очищення білків від вуглеводів: кислу промивку соєвого знежиреного борошна; екстракцію білків розчином етанолу; денатурацію білків за допомогою волого-теплової обробки з наступною екстракцією водою. Функціональні властивості отриманих такими способами білків при необхідності покращують обробкою пари або гомогенізацією.

Соеві білкові ізоляти є найбільш очищеної формою білкових препаратів, оскільки містять не менше 90% білка в перерахунку на абсолютно суху речовину (СР) (табл. 4).

Таблиця 7. Хімічний склад соєвих препаратів

Показники	Концентрати		Ізоляти	
	% від маси	% на СР	% від маси	% на СР
Білок (N x 6,25)	62-69	65-72	86-87	90-92
Жир (петролейний ефір)	0,5-1,0	0,5-1,0	0,5-1,0	0,5-1,0
Сира клітковина	3,4-4,8	3,5-5,0	0,1-0,2	0,1-0,2
Зола	3,8-6,2	4,0-6,5	3,8-4,8	4,0-5,0
Волога	4,0-6,0	0	4,0-6,0	0
Вуглеводи (залишок)	19-21	20-22	3,0-4,0	3,0-4,0

Застосовуючи осадження білка при значеннях рН, відмінних від ізоелектричної точки, отримують соєві ізоляти, розчиняються при різних значеннях реакції середовища, а додаткове збагачення їх кальцієм, гранулювання покращує харчову цінність, фізико-хімічні властивості і розширює сфери використання.

Суша пшенична клейковина – продукт, одержуваний методом водної екстракції небілкових і розчинних білкових компонентів з пшениці або пшеничного борошна. Процес здійснюється на спеціалізованих підприємствах або заводах крохмального виробництва. У світі розроблено близько 15 схем процесу отримання клейковини, що розрізняються по виду вихідної сировини (зерно, борошно), методом відділення білка від крохмалю (механічний, ферментний, хімічний), якості кінцевого продукту (денатурована і не денатурована клейковина) і способу отримання (з тіста або з борошняної бовтанки). До способів, за допомогою яких одержують суху клейковину висуваються наступні

вимоги: отримання максимального виходу, збереження природних властивостей, раціонального використання побічних продуктів та утилізації стічних вод. При використанні зерна у всіх способах є загальні операції: замочування, розмелювання, відділення крохмалю від клейковини та сушка продукту.

Для отримання білкових препаратів з біомаси хлібопекарських і пивних дріжджів використовують автоліз і ферментний лізис за допомогою дріжджолітичних ферментних препаратів і протеаз звичайного типу. Лізис дріжджів з використанням ферментних препаратів порівняно з автолізом представляє більш широкі можливості для одержання продуктів різного складу.

Застосування ферментних препаратів специфічної дії дозволяє швидко видалити клітинну стінку, а із звільнених протопластів виділяти продукти різного ступеня гідролізу залежно від цільового призначення. Для отримання не деградованих цитоплазматичних компонентів слід використовувати біомасу з низькою автолітичною активністю. Ферментний лізис клітинних стінок дріжджів проводять за допомогою різних ферментів і мультиензимних композицій.

Способи отримання продуктів глибокого розщеплення ґрунтуються на поєднанні автолізу дріжджів і їх лізису препаратами літичної або протеолітичної дії. Для активації протеолізу дріжджів використовують рослинні, тваринні та мікробні протеази. Протеази можуть бути неспецифічними у відношенні до дріжджового білка, але в поєднанні з автолітичними протеазами дріжджів дають хороший ефект. Так, наприклад, папаїн, пепсин, протосубтилін Г10х у співвідношенні з білком пекарських дріжджів 1:1000 гідролізують його не більше ніж на 4%, а додавання цих препаратів в тому ж співвідношенні до білка автолізуючих дріжджів через 5 год після початку автолізу дозволяє через годину отримати гідролізу білка до 95%. У контролі цей рівень досягається лише після 20 год. автолізу.

Із застосуванням препарату лізосубтиліну Г10х розроблено спосіб одержання білково-вітамінного корму з гідролізних дріжджів роду **Candida**. Процес включає наступні операції: кормові дріжджі з вологістю 75-90% нагрівають до температури 46-50°C, вносять лізосубтилін у кількості 0,2-0,5% до сухої речовини дріжджів, проводять гідроліз упродовж 20-30 год. за постійної температури та перемішування. Потім не гідролізовані залишки клітин відокремлюють сепарацією, а рідку фазу висушують. Сухий продукт є порошок солом'яно-жовтого кольору з приємним харчовим запахом. Вміст амінного азоту становить 4,3%,

близько половини визначених аміногруп належать вільним амінокислотам, серед яких переважають аланін, лізин, лейцин (відповідно 16,0; 15,7 і 12,4%).

Лізосубтилін може використовуватися для отримання білкових продуктів з дріжджів спиртового виробництва. Ці дріжджі мають помітну автолітичну активність, причому оптимальні умови автолізу і лізису лізосубтиліну збігаються, що дозволяє проводити процес за постійних значень рН і температури (рН 6,3-6,8, температура 50-55°C).

При дозі препарату 0,1% від сухої речовини біомаси дріжджів вихід розчинних форм азоту і вуглеводів зростає в 2,0-2,5 рази (порівняно з автолізом), через 6 год. у рідку фазу ферментного лізату переходить близько половини азотистих сполук і третина вуглеводів. Вихід амінного азоту становить близько 3% від сухої маси дріжджів.

Модифіковані білки (частково або повністю гідролізовані) отримують з білкових продуктів із застосуванням протеолітичних, ферментних препаратів (пепсин, папаїн, бромелаїн) або кислотного гідролізу. Вони використовуються як функціональні та смакові добавки до корму.

Лабораторна робота №15

Отримання білкових концентратів та ізолятів

Мета роботи.

Освоїти методів виділення білків із білоквмісних продуктів та їх кількісного визначення.

Завдання. Дослідити концентрацію залишкового білка і порівняти ефективність виділення білка з різної сировини.

Хід роботи.

1. Для створення кращих умов екстрагування білків необхідно просіяти борошно, виділяючи фракцію з розміром часток не більше 100 мкм, відкидаючи висівки, багаті крохмалем.

2. Зважити в хімічному стакані наважку борошна масою 10 г, поступово долити до неї 60 мл 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Суспензію настоювати 10-

15 хв. для розчинення білків. Вміст склянки розлити порівно в дві центрифужні пробірки.

3. Розділити суспензію на центрифuzі при швидкості обертання ротора 500 об/хв. та часу центрифугування 10 хв.

4. Центрифугат зібрати в чистий хімічний стакан і визначити за допомогою біуретового методу концентрацію білка.

5. Для цього в пробірку об'ємом 20 мл налити 2,4 мл розчину сечовини, 0,1 мл центрифугату і 2,5 мл біуретового реактиву. Записати час внесення біуретового реактиву. Суміш добре перемішати і помістити у водяну баню з температурою 40°C на 10 хв. Потім охолодити її до 20°C під струменем холодної води або на повітрі.

6. Через 30 хвилин після внесення біуретового реактиву визначити оптичну щільність розчину, користуючись кюветами № 5 і світлофільтром № 6 ФЕК-56. Кількість білка визначити за попередньо побудованої калібрувальної кривої.

7. У три пробірки об'ємом 20 мл налити по 5 мл центрифугату і провести екстракцію білків розчином сульфату алюмінію різної концентрації. У першу пробірку додати 5 мл 0,5% $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ з температурою 3-5°C, у другу – 5 мл 2,5% $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ з температурою 3-5°C, в третю – 5 мл 5% $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ з температурою 3-5°C. Вміст кожної з пробірок ретельно перемішати і провести висолювання білків за температури 3-5°C (у холодильнику) впродовж 15 хв.

8. Утворений осад відокремити фільтруванням через складчастий фільтр.

9. У фільтраті визначити кількість білка за допомогою біуретового методу відповідно до пунктів 5 і 6.

10. Розрахувати коефіцієнт вилучення білка

$$Б = \frac{C_{\text{н}} - C_{\text{к}}}{C_{\text{н}}}$$

де $C_{\text{н}}$ – концентрація білка в центрифугаті, г/л; $C_{\text{к}}$ – концентрація білка в фільтраті, г/л.

11. Отримані експериментальні дані та результати розрахунків вносять у табл. 5.

Таблиця 8. Експериментальні дані та результати розрахунків виділення білків з білоквмісних продуктів

Показники	Фугат	Фільтрат після осадження $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, %		
		0,5	2,5	5,0
Час внесення біуретового реактиву				
Середня оптична щільність				
Кількість розчинного білка				
Частка вилученого білка				

12. Побудувати графік залежності концентрації залишкового білка від концентрації екстрагенту і порівняти ефективність виділення білка з різної сировини.

Лабораторна робота №16 **Технологія виробництва кормових дріжджів і норми витрати барди**

Мета роботи.

Вивчити технології виробництва кормових дріжджів.

Завдання.

Освоїти технології одержання кормових дріжджів на зерно-картопляній барді, на мелясній після спиртовій барді.

Теоретичне обґрунтування

Кормові дріжджі, вирощені як на зерно-картопляній, так й на після спиртовій мелясній барді – цінна білкова добавка до раціону тварин та птахів. За своїми якостями вони наближаються до рибного борошна. Кормові дріжджі – біологічно активний продукт. При додаванні до рослинних кормів, незбалансованих за кількістю та складом протеїну, зростає ступінь засвоюваності білків на 10-15%, корми збагачуються вітамінами (особливо вітамінами групи В), ферментами, макро- і мікроелементами.

Кормові дріжджі випускають у вигляді порошку чи гранул. Залежно від показників якості розрізняють чотири групи кормових дріжджів: вищу, I, II і III. Вони мають яскраво-коричневий, яскраво-жовтий чи коричневий колір і характерний запах. Вміст вологи в дріжджах до 10%.

Технологія одержання кормових дріжджів на зерно-картопляній барді складається з наступних стадій: розмноження маточних дріжджів, виділення дробини (фільтрація барди), приготування поживного середовища, вирощування кормових дріжджів, виділення і згущення дріжджів, сушіння, розфасовки й упакування (рис.6).

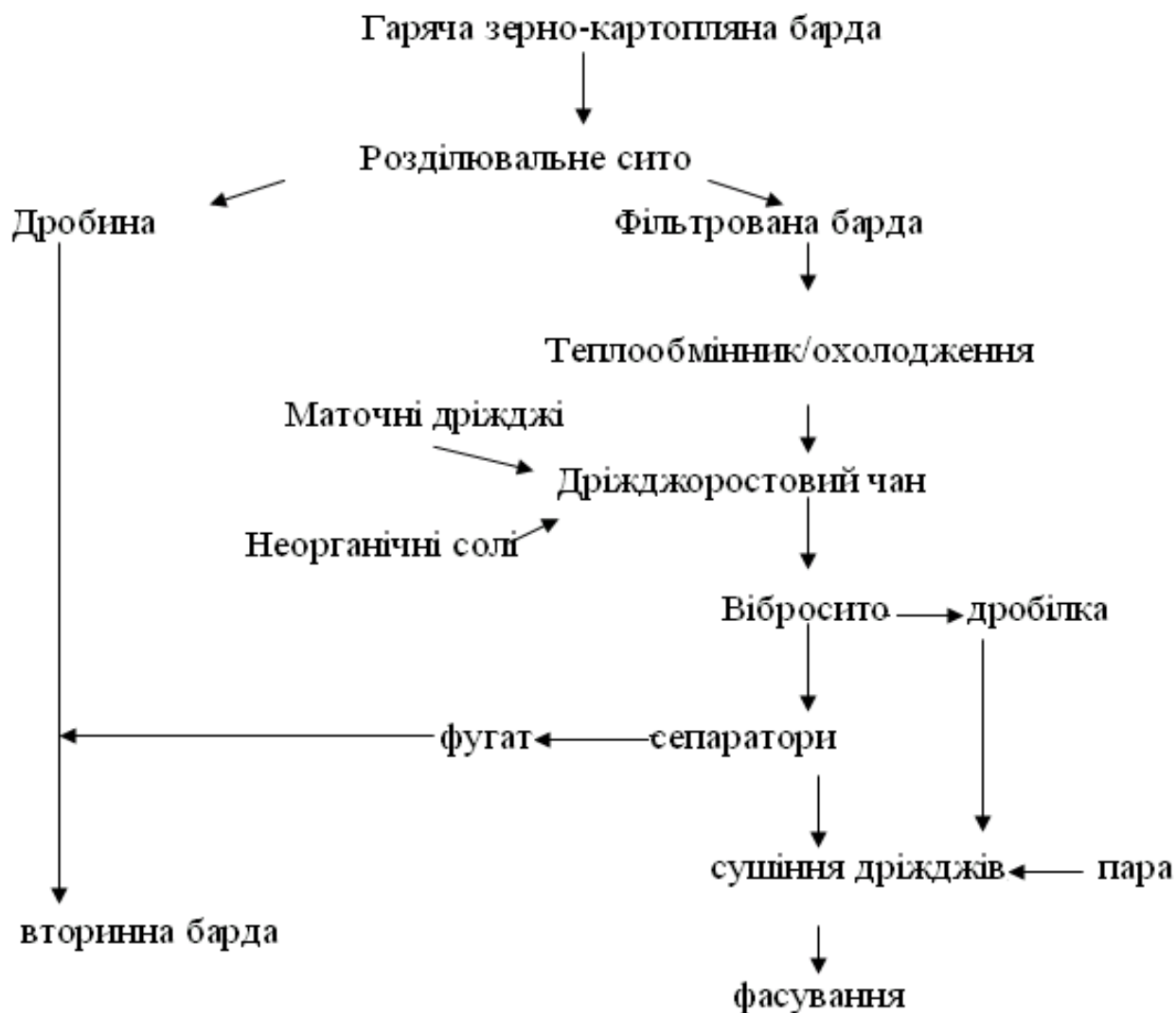


Рис. 6. Схема виробництва сухих кормових дріжджів при отриманні спирту із зерно-картопляної сировини.

Після вирощування дріжджі відокремлюються на сепараторах, а фугат змішується з дробиною від фільтрації барди з утворенням вторинної барда, кількість якої складає 72,2% вихідної.

Для нормування витрати зерно-картопляної барди на виробництво 1 т сухих кормових дріжджів установлені норми, що розроблені виходячи з існуючого регламенту на виробництво сухих кормових дріжджів з урахуванням удосконалення технологічної схеми, устаткування й інших заходів:

- при вирощуванні кормових дріжджів на зерновій барді – 3000 кг/1000 дал (декалітрів) спирту і на картопляної барді – 1700 кг/1000 дал спирту;

- при вирощуванні дріжджів на змішаній зерно-картопляній барді вихід сухих кормових дріжджів визначається як середньозважена величина і складає 2900 кг/1000 дал спирту (з розрахунку 10% картопляної і 90 % зернової барди).

Звідси норма витрати барди на 1т кормових дріжджів складає $13,5 \times 1000 / 2900 = 4,7$ дал/т, де 13,5 дал – середній вихід барди на 1 дал спирту.

Технологія кормових дріжджів, вирощуваних на мелясній після спиртовій барді. При переробці меляси на спирт упродовж року в кількості 1,4-1,8 млн. т утворюється 4,2-5,5 млн. т барди. За складом вона відрізняється від зернової і картопляної барди. Це пояснюється тим, що сахароміцети дріжджів використовують тільки 45-50% сухих речовин культуральної рідини, решта сухих речовин переходять у барду.

У після спиртовій мелясній барді міститься 7,5-10,0% сухої речовини і 90,0-92,5% води; сухі речовини барди на 67,0-72,0% складаються з органічних і на 28,0-33,0% з неорганічних речовин. Вона значно перевершує за вмістом золу зерно-картопляну барду: у першій міститься близько 3% золи, у другій – 0,5%.

Технологія кормових дріжджів, вирощуваних на після спиртовій барді, включає наступні стадії: кондиціонування барди, приготування поживного середовища, розмноження чистої культури і засівних дріжджів, вирощування кормових дріжджів, виділення і термоліз дріжджів, сушку, гранулювання і фасування дріжджів.

Кондиціонування барди полягає в стерилізації й охолодженні барди з наступним збагаченням середовища розчинами, що містять азот і фосфор. Мелясна барда з браго-ректифікаційного відділення надходить у збірник-стерилізатор безперервної дії цеху кормових дріжджів. У ньому барду витримують 45-60 хв за температури 95-98°C, після чого її направляють насосом у теплообмінник для охолодження.

М'яясну барду охолоджують до 20-25°C, а зерно-картопляну до 70°C. Останню далі фільтрують на роздільному ситі, у результаті чого одержують грубий фільтрат (80%) і дробину (20%). Дробина приєднується до вторинної після дріжджової барди, а також надходить на корм худобі. Грубий фільтрат після збагачення розчинами неорганічних солей, що містять азот і фосфор, надходить у дріжджогенератор і дріжджоростовий апарат. Розчини солей готують за розведення їх 5-кратною кількістю теплої води при перемішуванні. Витрата солей при переробці зерно-картопляної барди складає (кг/м³): сульфату амонію 5,0 чи карбаміду 2,0-3,0, ортофосфорної кислоти 0,09; при переробці м'яясної барди – відповідно карбаміду 1, ортофосфорної кислоти 1.

Розмноження чистої культури і засівних дріжджів. У цехах кормових дріжджів на м'яясно-спиртових заводах дріжджі з чистої культури вирощують періодично, поступово збільшуючи обсяг середовища від пробірки і колби до 0,2-2,0 м³ в апаратах чистої культури (АЧК), до 5,0-7,0 м³ у дріжджовому апараті. У колбах і АЧК дріжджі розмножуються на стерильному м'яясному суслі концентрацією 4-5% з добавкою неорганічних солей. У дріжджовому апараті і дріжджогенераторі посіяні дріжджі розмножуються на барді зі вмістом сухої речовини 6,8-7,2%. Розмноження дріжджів здійснюють за температури 33-35°C в аеробних умовах за рН середовища, рівному 4,5 (у дріжджогенераторах рН барди знижується до 3,5-3,8). Загальна тривалість вирощування засівних дріжджів у колбах, АЧК, дріжджовому апараті та дріжджогенераторі складає 2,5-3,0 діб. Концентрація біомаси зі вмістом вологи 75% зростає від колби до дріжджогенератора і складає відповідно 12 і 30 г/л.

У дріжджових цехах спиртових заводів, що працюють на зерно-картопляній барді, розмноження засівних дріжджів також починають у лабораторних умовах, а продовжують в АЧК-1 і АЧК-2. Засівні дріжджі далі направляють у дріжджо-ростовий апарат не рідше 1 разу в добу. У лабораторних умовах дріжджі засівають через кожні 5-10 діб на стерильне сусло; в АЧК-1 і АЧК-2 використовують грубий фільтрат барди, збагачений азотом і фосфоровмісними добавками.

На м'яясній після спиртовій барді вирощують чисті культури дріжджо-подібних грибів *Candida utilis*, штам Л-35, *Forulopsis pinus* Л-30, *Trichosporon cutaneum* Л-52, але їх використовують роздільно. Останній штам дріжджів успішно використовують за двостадійного вирощування дріжджів на II стадії, вони ростуть повільніше, ніж інші культури, але більш ефективно використовують важкодоступні пептиди,

пептони, ліпіди та інші речовини, що містяться в барді. При використанні зерно-картопляної барди в основному застосовують дріжджоподібні гриби ***Candida tropicales*** СК-44.

Вирощування кормових дріжджів. Здійснюють у дріжджо-ростових апаратах місткістю 320 і 600 м³ висотою 13,5 і 15,0 м. На 2-3 дріжджо-ростових апарати встановлюють один дріжджо-генератор місткістю 100 м³. Процес вирощування дріжджів здійснюють безперервно-потоким способом, при якому рівномірне і безупинне надходження поживного середовища відповідає такому ж відтоку дріжджової бражки. Найважливіша умова цього способу культивування – безперервне надходження свіжого поживного середовища, енергійне змішування його з культуральним середовищем з безупинною, інтенсивною аерацією повітрям для забезпечення дріжджових клітин розчиненим киснем. Рівномірний розподіл клітин по всій висоті апарату в усередненому поживному середовищі забезпечується спеціальною конструкцією ерліфтною системи аерації, за допомогою якої середовище перемішується за рахунок циркуляції, обумовленою швидкістю її підйому й опускання в апараті.

На мелясній барді товарні дріжджі вирощують, використовуючи середовище зі вмістом сухої речовини 6,8-7,2%, за рН 4,0-4,5, температурі 33-36°C і витраті повітря 55-60 м³/год. Час перебування середовища в апараті 7 год. Середовище підкисляють соляною кислотою. У дріжджовій бражці накопичується 35-45 г/л дріжджів.

Для повного використання засвоюваних речовин барди дріжджі вирощують з рециркуляцією сепараційних відтоків, що утворюються на стадії виділення дріжджів із дріжджової бражки, за допомогою відцентрових сепараторів. У цьому випадку працюють на нерозбавленій барді зі вмістом сухих речовин 9-10%. Завдяки рециркуляції відтоків знижуються втрати дріжджів у процесі сепарації, зменшується витрата барди, кислоти; знижується інфікованість середовища, тому що відтоки попередньо піддають кислотній обробці.

На зерно-картопляної барді дріжджі вирощують на грубому фільтраті барди зі вмістом сухої речовини 4-6% за рН 4,5-5,5 і температурі 35°C; середовище підкисляють сірчаною кислотою. Витрата повітря і тривалість процесу аналогічні даним, приведеним раніше.

Виділення і термоліз дріжджів. Дріжджова бражка на виході з дріжджо-ростового апарату є емульсією (рідина-газ), що містить 2/3 піни і 1/3 рідини. Для зменшення втрат дріжджів з відтоком на стадії сепарування необхідно дріжджову бражку деемульгувати, тобто

зруйнувати в ній піну. Це здійснюють за допомогою спеціальних піногасників (олеїнової кислоти, соапстоку та ін.) механічним шляхом за допомогою розділових насосів типу НР-70.

Перед сепаруванням дріжджова суспензія проходить сітчастий фільтр із діаметром отворів 0,25-3,00 мм для видалення домішок. Для виділення дріжджів, вирощених на мелясній барді, використовують три ступені сепараторів; у ході сепарування дріжджі двічі промивають чистою водою.

Знепінена рідина на сепараторах першої групи розділяється на відтік (~75%) і дріжджову суспензію (~30%) зі змістом біомаси 100-120 г/л. На другому ступені сепарування дріжджова суспензія згущається до 250-300 г/л, розбавляється, у збірнику водою до концентрації 150-200 г/л і подається насосом в III групу сепараторів, що працюють по замкнутому циклі з одночасним промиванням водою і згущенням суспензії до концентрації не менш 450-500 г/л (10-15% сухої речовини). У дріжджовому концентраті зерно-картопляних заводів вміст сухих речовин менше – 8-10%.

Потім згущена суспензія дріжджів піддається безупинному термолізу за 70-75°C упродовж 45 хв, у результаті чого дріжджові клітини біологічно знешкоджуються (відмирають).

Відтоки (фугати) при поділі дріжджової суспензії на станції сепарування кормових дріжджів зерно-картопляних спиртових заводів приєднують до вторинної після дріжджової барди, що разом із дробиною йде на корм худобі. На заводах, що використовують мелясу, відтоки скидають на поля фільтрації чи випарюють. Після I ступені сепарації одержують після дріжджову барду.

Сушіння, гранулювання і фасування дріжджів. Дріжджі сушать на вальцьових чи розпилювальних сушарках за температури 90-95°C до вмісту вологи 8-10%. У першому випадку дріжджі сушать парою безконтактним, а в другому – контактним способом, за якого як сушильний агент використовують суміш пічних газів і повітря. Температура сушильного агента на вході в сушарку 300°C, на виході – 85-90°C. Дріжджі нагріваються до температури 90-95°C, що гарантує їм високу якість структури і кольору порошку, а також вміст засвоюваного білка. Сушіння дріжджів здійснюється при невеликому розрідженні. Відпрацьовані гази, перед викидом в атмосферу обов'язково проходять мокрий чи сухий фільтр для уловлювання висушених дріжджів. При використанні мокрого пиловловлювача ефективність уловлювання дріжджового пилу складає 95-97%. Для того щоб уникнути трудомісткого

процесу в несприятливих санітарних умовах при упакованні кормових дріжджів, їх гранулюють на спеціальному прес-грануляторі. Діаметр гранул 9-13 мм, вміст вологи в гранулах 9-11%. Вміст вологи в дріжджах на виході із сушарки 8-10%.

Лабораторна робота №17

Отримання білкових препаратів шляхом культивування гриба *Penicillium roqueforti* на рідкому поживному середовищі.

Мета роботи.

Ознайомитися з особливостями отримання мікробної біомаси на різних субстратах.

Завдання.

Вивчити здатність цвілевих грибів до продукування білка на молочній сироватці.

Теоретичне обґрунтування

В даний час найбільш дефіцитним компонентом їжі є білок, особливо білок високої поживної цінності. Основним шляхом зниження та ліквідації цього дефіциту є виробництво біомаси за допомогою мікробного синтезу. Мікробіологічне виробництво білка не вимагає посівних площ, не залежить від кліматичних і погодних умов, піддається точному плануванню і високому рівню автоматизації, дозволяє отримувати продукцію стандартної якості.

Як продуценти мікробного синтезу білка можуть бути використані такі мікроорганізми, які мають здатність на поживному середовищі та фізико-хімічних умов культивування синтезувати в підвищених кількостях переважно ті сполуки, які є цільовим (основним) продуктом даного виробництва. Ефективність того чи іншого мікроорганізму-продуцента для виробничих цілей визначається, з одного боку, швидкістю його росту, з іншого – ступенем використання поживних речовин. Велике значення при цьому мають також морфологічні особливості продуцента (розміри клітин, здатність виділятися з середовища при використанні різних технологічних прийомів тощо)

Як субстрат для отримання мікробної біомаси в різних країнах використовують вуглеводну або вуглецевмісну сировину. Для великомасштабних процесів найбільш придатні вуглеводні:

- н-алкани – насичені з нерозгалуженим ланцюгом вуглеводні з довжиною вуглецевого ланцюга C₉-C₁₈, одержувані з нафти. Окиснювати вуглеводні здатні багато мікроорганізмів: бактерії, актиноміцети, дріжджі, мікроскопічні гриби. Найбільше значення мають аспорогенні дріжджі ***Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis***;

- природний газ – найдешевший вид сировини для виробництва білка. Метан використовують тільки бактерії, їх культивування пов'язано з рядом труднощів: вибухонебезпечність (метан утворює з киснем вибухонебезпечну суміш), низька розчинність метану в культуральній рідині, повільний ріст мікроорганізмів та їх підвищена потреба в кисні. До облигатних метанотрофів відносять бактерії родів ***Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas***.

Перспективним є одержання біомаси мікроорганізмів на ферментованих гідролізатах целюлозовмісної сировини – відходах деревообробної промисловості та сільського господарства. Ускладненням для промислової реалізації такого процесу є те, що в целюлозовмісній сировині міститься лігнін, який перешкоджає проникненню в субстрат ферменту целюлази. Крім того, сировина потребує обробки, що дозволяє знизити вміст у ньому кристалічної форми целюлози і перевести її в аморфний стан, після чого ферментний гідроліз значно прискорюється. На більшості гідролізних заводах впроваджені продуктивні штами кормових дріжджів ***Candida scottii* і *Candida tropicalis***.

Меляса – побічний продукт виробництва цукру з цукрової тростини і цукрового буряка, багата вуглеводами, цінними органічними та мінеральними речовинами, амінокислотами, вітамінами. Вміст цукрози до 60%.

Молочна сироватка – дуже багата різними біологічно активними сполуками, вона містить у середньому 70-80% лактози, 7-15% білкових речовин, 2-8% жиру, 8-10% мінеральних солей. Крім того, молочна сироватка має у своєму складі значну кількість вітамінів, гормонів, органічних кислот, мікро- і ультрамікроелементів.

Наявність у молочній сироватці легко засвоюваних багатьма видами мікроорганізмів джерел вуглецю, а також різних ростових факторів робить її цінним поживним середовищем для отримання продуктів мікробного синтезу. Велике значення має те, що застосування молочної сироватки не вимагає спеціальної складної підготовки, а культуральна рідина після вирощування мікроорганізмів може бути використана в харчових і кормових цілях без обробки.

При використанні мікробної маси, отриманої на молочної сироватці,

була виявлена її висока ефективність для тваринництва та птахівництва.

Матеріали, обладнання та реактиви.

Колби об'ємом 250 мл з ватяними пробками – 6 шт.; скляні палички – 5; піпетки градуйовані на 10 мл – 6, на 1 мл – 6; циліндри мірні на 100 мл – 6; лійки діаметром 10-15 см – 6; скляні стаканчики на 50 мл – 6; мірні колби на 50 мл – 6; фільтри паперові складчасті – 6; фільтрувальний папір; щільні фільтри – 6; колби конічні на 100 мл – 6; мікробюретки – 1; бюретка для титрування на 25 мл – 1; стерильні піпетки на 1 мл – 2; спиртівка, бактеріологічна петля. Вага електронна; рефрактометр; рН-метр; фотоелектроколориметр; термостат. Реактиви: молочна сироватка, 0,1 N розчин NaOH, фенолфталеїн, тимолфталеїн, 1 N розчин NaOH, суспензія фосфату Купруму, йодит калію, крохмаль, 0,01% розчин тіосульфату натрію, ацетатна кислота (концентрована), 2,5% розчин сульфосаліцилової кислоти, пробірки з чистою культурою *Penicillium roqueforti* – 2, пробірки зі стерильною водою – 2.

Хід роботи.

1. Визначаємо рН поживного середовища за допомогою рН-метра.

2. Визначаємо титровану кислотність поживного середовища. У колбу на 100 мл відмірюють 10 мл молочної сироватки, додають 20 мл дистильованої води, 3-4 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 N розчином NaOH до слабо-рожевого забарвлення. Титровану кислотність поживного середовища (K), в градусах Тернера, розраховують за формулою:

$$K = V_1 \cdot 10 ,$$

де K – титрована кислотність, °Т; V_1 – об'єм 0,1 N розчину NaOH мл, який використано на титрування 10 мл поживного середовища (молочної сироватки); 10 – коефіцієнт перерахунку на 100 мл поживного середовища.

3. Вміст сухих речовин у поживному середовищі досліджують за допомогою рефрактометра.

4. Амінний азот поживного середовища визначають йодометричним методом. У мірну колбу об'ємом 50 мл піпеткою вносять 10 мл молочної сироватки, додають 3-4 краплі тимолфталеїну і по краплях 1 N розчин NaOH до появи блідо-блакитного забарвлення. До слабо-лужного розчину з мірного циліндра при помішуванні доливають 30 мл суспензії фосфату Купруму, вміст колби доводять водою до мітки, перемішують і фільтрують через щільний фільтр. Фільтрат повинен бути абсолютно прозорим. 10 мл фільтрату піпеткою переносять у конічну колбу, додають

0,5 мл ацетатної кислоти, 1 г йодиду калію і перемішують. Виділений йод титрують з мікробюретки 0,01 N розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1-2 краплі розчину крохмалю. Закінчення титрування визначають по зникненню синього забарвлення. Кількість амінного азоту (X) обчислюють за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 0,28 \cdot V \cdot 10 \cdot 100}{50},$$

де X – кількість амінного азоту, мг/100 мл, а – кількість 0,01 N розчину тіосульфату натрію, витраченого на титрування, мл; V – об'єм досліджуваної рідини, взятий на аналіз, мл.

Приготування посівної суспензії і засів поживного середовища

1. Кожну колбу підписують (група, прізвище, тривалість культивування) і встановлюють у термостат на 3, 5, 7 діб за температури 25-27°C.

2. Визначення приросту біомаси гриба-продуцента. На аналітичних вагах зважують попередньо висушені до постійної маси фільтри. Вміст колб фільтрують через фільтр, при цьому біомасу гриба шпателем переносять на фільтр. Біомасу на фільтрі сушать у сушильній шафі за температури 130°C впродовж 1 години. Висушені таким чином фільтри з біомасою охолоджують в ексікаторі і зважують на аналітичних вагах. Масу сухого міцелію (B), г, розраховують за формулою:

$$B = B_2 - B_1,$$

де B₁ – маса порожнього фільтра, г; B₂ – маса фільтра з біомасою, г.

3. Визначення рН культуральної рідини проводять за допомогою рН-метром.

4. Визначення титрованої кислотності культуральної рідини. У колбу на 100 мл відбирають 10 мл відфільтрованої рідини, додають 20 мл дистильованої води, 3-4 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 N розчином NaOH до слабо-рожевого забарвлення. Кислотність розраховують так само, як й для поживного середовища.

5. Визначення вмісту сухих речовин у культуральній рідині проводять за допомогою рефрактометра.

6. Визначення амінного азоту в культуральній рідині проводять йодометричним методом так само, як й для поживного середовища.

7. Визначення білка колориметричним методом. Близько 0,5 г досліджуваного подрібненого на борошно зразка зважують на аналітичних вагах з точністю до ± 0,001 г і поміщають у конічну колбу місткістю 250 см³, забезпечену пробкою. У колбу додають піпеткою 50

см³ розчину гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/дм³. Колбу закривають пробкою і струшують на механічній гойдалці впродовж 15 хв. Потім витяжку центрифугують 10 хв. при частоті обертання 6000 хв⁻¹ і 5 см³ прозорого центрифугату піпеткою переносять у мірну колбу на 50 см³, вміст колби доводять до мітки сульфосаліциловою кислотою. Паралельно готують контрольний зразок. Для цього 5 см³ дистильованої води переносять у мірну колбу на 50 см³, вміст колби доводять до мітки сульфосаліциловою кислотою.

При нефелометричному аналізі отримання точних результатів залежить від порядку і швидкості змішування розчинів. Тому після додавання сульфосаліцилової кислоти колби швидко струшують, розчини наливають у кювети з товщиною шару 5 мм і вимірюють величину оптичної щільності розчинів за довжини хвилі 550 нм. Заміри слід проводити відразу після додавання кислоти, тому що частинки білка швидко агрегують. За величиною оптичної щільності білкової витяжки визначають масову частку білка за допомогою калібрувального графіка (рис.7).

Масову частку білка (X,%) розраховують за формулою:

$$X = \frac{B \cdot 100}{1000 \cdot n},$$

де B – вміст білка в наважці, мг; n – наважка, взята для визначення, г.

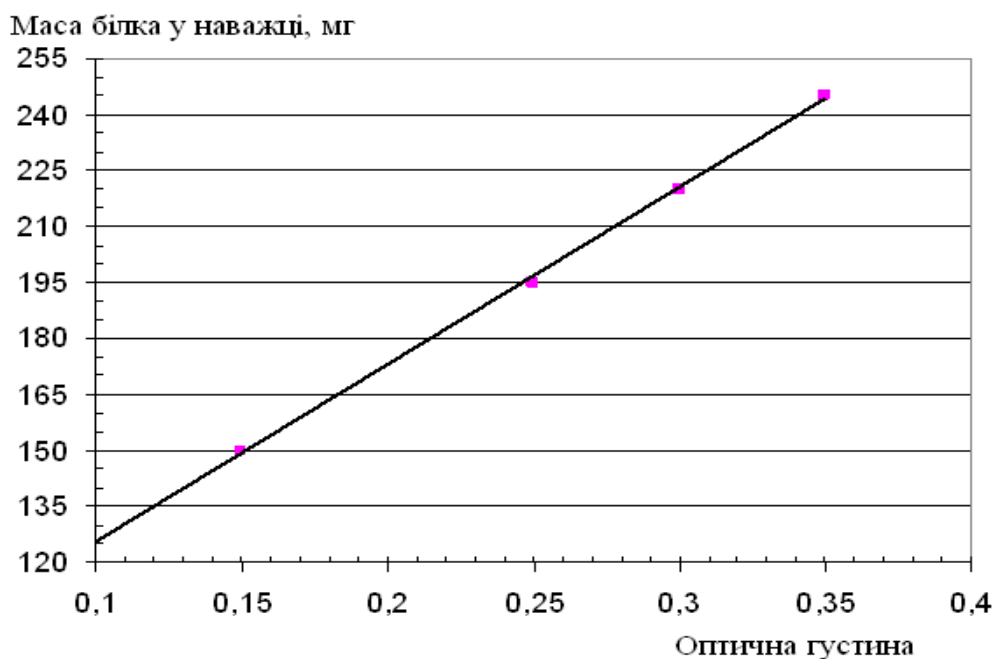


Рис. 7. Калібрувальний графік для визначення білка

Результати досліджень вносять в таблицю 6. На підставі даних таблиці будують графіки приросту біомаси (рис. 8.) і накопичення білка в біомасі (рис. 9) в процесі культивування гриба-продуцента.

Таблиця 9.

Культивування, діб	
pH до культивування	
pH після культивування	
Титрована кислотність до культивування, °Т	
Титрована кислотність після культивування, °Т	
Приріс біомаси, г	
Амінний азот до культивування, мг/100 мл	
Амінний азот після культивування, мг/100 мл	
Вміст білка, в % на суху речовину	
Суха речовина до культивування, %	
Суха речовина після культивування, %	

На основі отриманих результатів роблять висновок про здатність гриба *Penicillium roqueforti* продукувати білок на молочній сироватці і визначають, на яку добу відбувається максимальний приріст біомаси та накопичення білка.

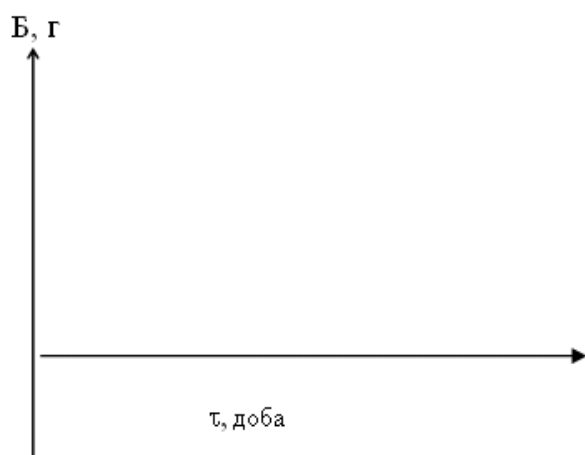


Рис. 8. Приріст біомаси в процесі культивування гриба-продуцента.

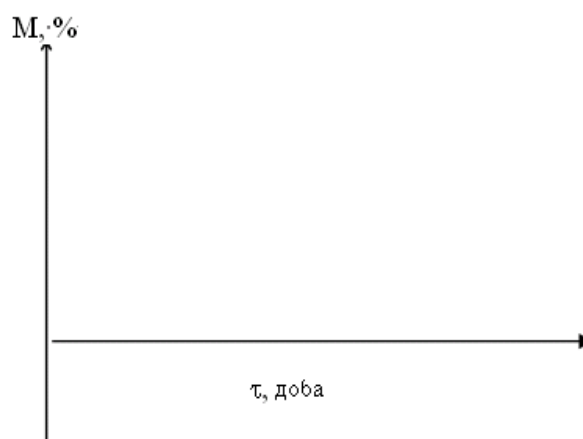


Рис.9. Накопичення білка в біомасі в процесі культивування гриба-продуцента.

Рекомендована література

Основна

1. Біохімія ензимів / Марченко М.М., Худа Л.В., Великий М.М., Остапченко Л.І. Чернівці: Чернівецький національний університет, 2012. 416 с.
2. Галузі сучасної біотехнології: підручник для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / С. В. Дігтяр та ін.; за ред. проф. Никифорова В. В. Кременчук: Кременчуцький національний університет імені Михайла Остроградського, 2021. 125 с
3. Курта С.А. Промислові біотехнології. Курс лекцій. Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника. Івано-Франківськ, Супрун В.П., 2018. 197с.
4. Біохімія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Харчова хімія. Розділ: Основи біохімії» для студентів спеціальності 181 Харчові технології / уклад. О.М. Савченко, О.І. Сиза. Чернівці: НУЧК імені Т.Г. Шевченка, 2023. 125 с.
5. Bajić B, Vučurović D, Vasić Đ, Jevtić-Mučibabić R, Dodić S. Biotechnological Production of Sustainable Microbial Proteins from Agro-Industrial Residues and By-Products. *Foods*. 2022; 12(1):107. doi: 10.3390/foods12010107.
6. Banks M., Johnson R., Giver L., Bryant G., Guo M. Industrial production of microbial protein products. *Current Opinion in Biotechnology*. 2022; 75:102707. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102707>
7. Derbyshire EJ, Theobald H, Wall BT, Stephens F. Food for our future: the nutritional science behind the sustainable fungal protein - mycoprotein. A symposium review. *J Nutr Sci*. 2023; 11;12:e44. doi: 10.1017/jns.2023.29.
8. Ribeiro G.O., Rodrigues L.A.P., Dos Santos T.B.S., Alves J.P.S., Oliveira R.S., Nery T.B.R., Barbosa J.D.V., Soares M.B.P. Innovations and developments in single cell protein: Bibliometric review and patents analysis. *Front Microbiol*. 2023; 13:1093464. doi: 10.3389/fmicb.2022.1093464.
9. Strong P.J., Self R., Allikian K., Szewczyk E., Speight R., O'Hara I., Harrison M. D. Filamentous fungi for future functional food and feed. *Current Opinion in Biotechnology*. 2022; 76, 102729. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102729>

10. Takefuji Yoshiyasu Sustainable protein alternatives. Trends in Food Science & Technology. 2021; 107, 429–431
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.012>

Допоміжна

1. Герасименко В. Г. Біотехнологія. Київ: Вища школа, 2008. 343 с.
2. Білки та ферменти: збірник задач, вправ та тестових завдань з дисципліни "Біологічна хімія" для самостійної аудиторної та позааудиторної роботи студентів 2 курсу медичних факультетів спеціальності "Лікувальна справа"/ К. В. Александрова, С. В. Левіч, О. Б. Макоїд, Д. М. Сінченко, Є. К. Михальченко. Запоріжжя : ЗДМУ, 2017, 89 с.
3. Капрельянц Л.В. Теоретичні основи біотехнології: навч. посіб. для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія». Харків: «Факт», 2020. 291 с.
4. Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм: навч. посіб. для студентів біотехнологічних спеціальностей. Харків:ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД». 2020. 279 с.
5. Штапенко О. В., Гевкан І. І., Сирватка В. Я., Сливчук О. Ю., Корбецька О. О., Корнят С. Б., Яремчук І. М. Створення комбінованих стабілізуючих композицій для збереження активності гонадотропінів у рідкій формі препарату. Біологія тварин, 2022. 24(3):14-17.
<https://doi.org/10.15407/animbiol24.03.014/>
6. Інноваційні технології харчових виробництв : монографія / за ред. д.т.н., проф. Піддубного В. А. – Київ : Кондор-Видавництво, 2017. – 374 с.
7. Koukoumaki D. I., Tsouko E., Papanikolaou S., Ioannou Z., Diamantopoulou P., Sarris D. Recent advances in the production of single cell protein from renewable resources and applications, Carbon Resources Conversion. 2024; 7(2), 100195.
<https://doi.org/10.1016/j.crcon.2023.07.004>.

Контрольні питання

1. Які органічні сполуки називаються білками?
2. Що таке первинна, вторинна і третинна структури білка?
3. Чому білки володіють амфотерними властивостями?
4. Що таке цвітерйон?
5. Які фактори обумовлюють стійкість білків у розчинах?
6. Що таке денатурація білків і від чого вона залежить?
7. В яких умовах настають зворотне та незворотне осадження білків?
8. Як змінюються фізико-хімічні та біологічні властивості білків при денатурації?
9. Що таке ізоелектричний стан та ізоелектрична точка білка?
10. У чому суть біуретового методу визначення концентрації білків?
11. З якою метою проводять діаліз розчинів білка?
12. В чому суть хроматографії? Її практичне значення.
13. В чому суть хроматографічного методу розділення суміші амінокислот?
14. Класифікація хроматографії за механізмом процесу розділення.
15. В чому суть адсорбційної хроматографії?
16. Де застосовується розділювальна хроматографія?
17. Що лежить в основі йонообмінної хроматографії?
18. В чому суть методу гелі-фільтрації (ексклюзивна фільтрація)?
19. В чому полягає суть колонкової хроматографії?
20. В чому полягає суть тонкошарової хроматографії?
21. В чому полягає суть паперової хроматографії?
22. В чому полягає суть капілярної хроматографії?
23. Що таке вискоєфективна рідинна хроматографія?
24. Що таке газова хроматографія?
25. В чому суть техніки хроматографічного поділу суміші речовин на колонці з оксидом алюмінію або силікагелем?
26. У якого методу фракціонування нерухома фаза представлена рідиною, яка ідентична рідині рухомої фази?
27. У якого методу фракціонування нерухома та рухома фази представлені двома рідинами, які не змішуються або змішуються частково (вода/органічний розчинник)?
28. У якій хроматографії адсорбція проходить за рахунок біоспецифічної взаємодії між молекулами, які закріплені на матриці та комплементарними молекулами, які надходять та елюють з рухомою

фазою?

29. У якій хроматографії матрицею є аніони або катіони?
30. Який реагент найчастіше використовується для концентрування білкових розчинів?
31. Який метод фракціонування білків потребує наступного діалізу білкового розчину?
32. Які аніони солей мають найбільшу здатність до висолювання білків (ряд Гофмейстера)?
33. Які методи використовуються в лабораторній роботі для виділення білків та їх кількісного визначення?
34. У чому суть визначення білка колориметричним методом?
35. Від яких факторів залежить ефективність виділення білка?
36. Які існують шляхи для усунення дефіциту білка?
37. Які переваги має біотехнологічний підхід виробництва білка над традиційним?
38. Які мікроорганізми використовуються як продуцентами кормового білка?
39. Які особливості мають дріжджі як продуценти білка?
40. Які переваги та недоліки мають непатогенні бактерії – продуценти білка?
41. Якою особливістю володіють мікроскопічні гриби як продуценти білка?
42. Чим відрізняються від інших продуцентів білка мікроводорості?
43. За якою технологічною схемою відбувається процес одержання мікробного білка?
44. В яких умовах здійснюється надсинтез мікробного білка?
45. Яка сировина використовується для одержання мікробного білка?
46. Які перспективи має технологія одержання кормового білка на відходах переробки нафти?
47. Які особливості технологічного процесу культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на природному газі (метані)?
48. Які штами-продуценти є ефективними при використанні як субстрату метанолу?
49. Чим характеризується білок (еприн), отриманий на етиловому спирті?
50. Якого розповсюдження набула технологія одержання білка одноклітинних водоростей в Україні?

51. Чим обумовлена перспектива використання як сировини одержання мікробного білка з відходів агропромислового комплексу?
52. Які особливості та перспективи глибинного культивування або ферментації у зануреній культурі?
53. Суть і типи твердофазової ферментації?
54. Перспективи використання мікробного білка у харчуванні людей?
55. Якими якостями характеризуються кормові дріжджі?
56. Наведіть схему виробництва сухих кормових дріжджів при отриманні спирту із зерно - картопляної сировини.
57. Складіть технологічну схему виробництва сухих кормових дріжджів на мелясній барді.
58. Опишіть технологічні операції етапу кондиціювання барди.
59. Опишіть технологічні операції етапу приготування поживного середовища.
60. Опишіть технологічні операції етапу розмноження чистої культури і засівних дріжджів.
61. Опишіть технологічні операції етапу вирощування кормових дріжджів.
62. Опишіть технологічні операції етапу виділення і термолізу дріжджів.
63. Чим відрізняються білкові ізоляти, білкові концентрати та білкові продукти?
64. Наведіть норми витрати зерно - картопляної барди на виробництво 1 т сухих кормових дріжджів.
65. Яке цільове призначення білкових концентратів та ізолятів?
66. Яка сировина використовується для отримання білкових концентратів?
67. Чим відрізняються технології одержання білкових продуктів з різних видів сировини?
68. Які способи використовують для виділення і очищення білкових концентратів та ізолятів?
69. З якою метою в технології білкових ізолятів використовують ферментні препарати?
70. До якої групи білоквмісних продуктів відносяться виділені з борошна злакових і бобових культур зразки?
71. Які вимоги висуваються до мікроорганізмів-продуцентів?
72. Чому молочна сироватка часто використовується як поживного середовища?

73. Як визначають масу сухого міцелію?
74. Що таке субстрат?
75. Які джерела вуглецю використовують у біотехнологічному виробництві?
76. Які джерела азоту засвоюються мікроорганізмами?
77. Яким чином у поживні середовища вводять джерела вітамінів та мікроелементів?
78. Як здійснюють поверхневе культивування?
79. Як вноситься фосфор у поживне середовище?
80. Як визначають вміст сухих речовин у поживному середовищі?
81. У чому суть потенціометричного методу титрування.
82. Які існують методи одержання незамінних L-амінокислот у промисловому масштабі?
83. Які особливості має хімічний метод одержання L-амінокислот? Недоліки методу.
84. Що таке рацемічна суміш і яким шляхом проводиться її розділення?
85. Які переваги має мікробний синтез амінокислот над хімічним?
86. За якими технологічними схемами можна здійснювати промислове виробництво L-амінокислот?
87. У яких формах випускаються препарати амінокислот?
88. На чому базується біотехнологія одержання L-метіоніну?
89. Яким шляхом одержують L-триптофан?
90. Який іммобілізований біокатализатори використовується для розділення рацемічної суміші?
91. Які штами-продуценти використовуються для мікробного синтезу L-триптофану?
92. Яким шляхом одержують L-лізин?
93. Які існують шляхи мікробного синтезу L-лізин?
94. Де застосовують L-глутамінову кислоту?
95. Які продуценти використовуються у мікробному синтезі L-глутамінової кислоти?
96. Методи одержання у промислових обсягах L-глутамінової кислоти.
97. Де застосовують L-треонін?
98. Які існують шляхи одержання L-треоніну?
99. Яким методом можна вдосконалити біотехнологію виробництва L-треоніну?

Перелік питань для індивідуального опрацювання

1. Одержання та очистка вуглеводнів, спиртів для їх подальшого застосування як сировини в біотехнологічних процесах.
2. Одержання вуглеводів гідролізом рослинної сировини для їх подальшого застосування як субстрату в процесах мікробного синтезу.
3. Використання відходів цукрової промисловості для промислового одержання кормового білка.
4. Використання відходів паперово-целюлозної промисловості для промислового одержання кормового білка.
5. Типова технологічна схема процесу мікробного синтезу кормового білка.
6. Технологія одержання кормових дріжджів на нафтових дистилатах та рідких парафінах.
7. Технологія одержання кормових дріжджів на спиртах та гідролізатах рослинної сировини.
8. Технологія одержання кормових дріжджів на відходах цукрової промисловості.
9. Технологія одержання кормових дріжджів на відходах паперово-целюлозної промисловості.
10. Технологія одержання кормових дріжджів на відходах картопле переробної промисловості.
11. Мікроорганізми-продуценти кормових дріжджів, умови їх культивування, технологічні параметри та особливості.
12. Особливості культивування грибних культур – продуцентів білка та переваги грибного протеїну.
13. Продуценти грибного протеїну, умови вирощування, сировина, способи подальшої переробки.
14. Переробка вуглеводвмісної сировини в грибний білок.
15. Делігніфікація соломи та використання її для отримання грибних білкових продуктів.
16. Біотехнологія культивування їстівних базидильних грибів.
17. Одержання L-лізину та кормових препаратів на його основі.
18. Виробництво L-глутамінової кислоти одно- і двоступеневим методом біосинтезу та одержання високо очищеної L-глутамінової кислоти та глутамату натрію.
19. Мікробний біосинтез L-триптофану, виділення та очистка.
20. Основні методи фракціонування і очистки білків.

Зміст

Основні вимоги з техніки безпеки	3
Тема I. Методи деструкції клітин, фракціонування їх вмісту.	
Основні методи фракціонування та очистки білків	4
Лабораторна робота №1. Руйнування популяції <i>Escherichia coli</i> лізоцимом яєчного білка	6
Лабораторна робота №2. Очищення білків шляхом висолювання	7
Лабораторна робота № 3. Реакції осадження білків та визначення ізоелектричної точки білка (желатину)	8
Тема II. Кількісні та якісні методи визначення складових білків	12
Лабораторна робота № 4. Визначення концентрації мікробного білка за допомогою біуретової реакції та реакцією Лоурі	12
Лабораторна робота № 5. Виявлення α -амінокислот у складі білків (нінгідринова реакція)	15
Лабораторна робота № 6. Виявлення у складі білків залишків сірковмісних амінокислот цистеїну й цистину (реакція Фоля)	16
Лабораторна робота № 7. Виявлення у складі білків ароматичних амінокислот (ксантопротеїнова реакція)	17
Лабораторна робота № 8. Виявлення триптофану в складі білків реакцією Адамкевича	19
Лабораторна робота № 9. Виявлення триптофану в складі білків реакцією Вуазене	20
Тема III. Методи розділення білків	
Діаліз. Теоретичне обґрунтування	21
Лабораторна робота № 10. Очищення розчину білка методом діалізу	20
Лабораторна робота № 11. Фракціонування нативної сироватки насиченим розчином амонію сульфату	23
Лабораторна робота № 12. Фракційне осадження білків методом висолювання	25
Тема IV. Хроматографічні методи фракціонування біомолекул	26
Лабораторна робота № 13. Розділення білків та суміші амінокислот методом паперової хроматографії	29
Тема V. Фракціонування білків методом електрофорезу	36
Лабораторна робота № 14. Електрофорез білків у поліакриламідному гелі	37
Тема VI. Виробництво кормових білків	42
Лабораторна робота № 15. Отримання білкових концентратів та	

ізолятів	45
Лабораторна робота №16. Технологія виробництва кормових дріжджів і норми витрати барди	47
Лабораторна робота №17. Отримання білкових препаратів шляхом культивування гриба <i>Penicillium roqueforti</i> на рідкому поживному середовищі.	53
Рекомендована література	59
Контрольні питання	61
Перелік питань для індивідуального опрацювання	65

**Штапенко Оксана Всеволодівна
Буцяк Василь Іванович
Слободян Соломія Олегівна
Кіт Наталія Петрівна**

НАВЧАЛЬНЕ ВИДАННЯ

БІОТЕХНОЛОГІЯ БІЛКІВ

**методичні вказівки для лабораторних робіт
здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»**

Підписано до друку 26.11.2024 р. Формат 60x84 ^{1/16}
Папір офсетний. Тираж 100 прим.
Видавництво “Папірсу”