

**И.М. Грачева, Ю.П. Грачев**

**Лабораторный практикум по  
технологии ферментных  
препаратов**

**Москва**  
**«Книга по Требованию»**

УДК 57  
ББК 28  
И11

И11 **И.М. Грачева**  
Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов / И.М. Грачева, Ю.П. Грачев – М.: Книга по Требованию, 2021. – 177 с.

**ISBN 978-5-458-37033-2**

Изложены биохимические и физико-химические методы анализа микробных ферментных препаратов, их активностей; лабораторные работы по следующим темам: поверхностное культивирование микроскопических грибов и бактерий; экстракция ферментов из выращенных культур; глубинное культивирование микроорганизмов; концентрирование ферментных растворов; выделение и очистка ферментных препаратов; стабилизация готовых препаратов. Даны темы для выполнения студенческих научно-исследовательских работ. Описаны методы математического планирования и обработки результатов экспериментов. Для студентов вузов, обучающихся по специальности 1015 «Технология микробиологических производств».

**ISBN 978-5-458-37033-2**

© Издание на русском языке, оформление

«YOYO Media», 2021

© Издание на русском языке, оцифровка,

«Книга по Требованию», 2021

Эта книга является репринтом оригинала, который мы создали специально для Вас, используя запатентованные технологии производства репринтных книг и печати по требованию.

Сначала мы отсканировали каждую страницу оригинала этой редкой книги на профессиональном оборудовании. Затем с помощью специально разработанных программ мы произвели очистку изображения от пятен, кляксы, перегибов и попытались отбелить и выровнять каждую страницу книги. К сожалению, некоторые страницы нельзя вернуть в изначальное состояние, и если их было трудно читать в оригинале, то даже при цифровой реставрации их невозможно улучшить.

Разумеется, автоматизированная программная обработка репринтных книг – не самое лучшее решение для восстановления текста в его первозданном виде, однако, наша цель – вернуть читателю точную копию книги, которой может быть несколько веков.

Поэтому мы предупреждаем о возможных погрешностях восстановленного репринтного издания. В издании могут отсутствовать одна или несколько страниц текста, могут встретиться невыводимые пятна и кляксы, надписи на полях или подчеркивания в тексте, нечитаемые фрагменты текста или загибы страниц. Покупать или не покупать подобные издания – решать Вам, мы же делаем все возможное, чтобы редкие и ценные книги, еще недавно утраченные и несправедливо забытые, вновь стали доступными для всех читателей.



# ГЛАВА I

## МЕТОДЫ АНАЛИЗА МИКРОБНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

### § 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

#### Определение общего азота

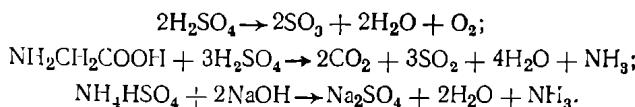
##### МЕТОД КЬЕЛЬДАЛЯ

Метод основан на минерализации навесок при нагревании с концентрированной серной кислотой в присутствии катализатора (металлической ртути и селена, оксида меди). Для повышения температуры в реакционную колбу добавляют сульфат калия. Добавление окислителей, например пероксида водорода, также ускоряет реакцию.

Серная кислота при нагревании распадается на триоксид серы ( $\text{SO}_3$ ) и активный кислород, за счет которого и происходит интенсивное окисление органических веществ.

Продуктами окисления являются диоксид углерода ( $\text{CO}_2$ ), диоксид серы ( $\text{SO}_2$ ), вода и аммиак. Последний, находясь в реакционной колбе, связывается с серной кислотой с образованием аммиачной соли. Полученную соль разлагают 40%-ным раствором гидроксида натрия, освободившийся при этом аммиак отгоняют в титрованный раствор серной кислоты.

В схематическом виде весь процесс можно представить следующим образом:



**Необходимые реагенты.** 0,1 н. раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 0,1 н. раствор  $\text{NaOH}$ ; концентрированная химически чистая серная кислота (относительная плотность 1,833); сме-

шанный индикатор — 50 см<sup>3</sup> раствора метилового синего (1 г метилового синего в 800 см<sup>3</sup> 95%-ного спирта) смешивают со 100 см<sup>3</sup> раствора метилового красного (1 г метилового красного в 750 см<sup>3</sup> 95%-ного спирта), в кислом растворе индикатор дает красно-фиолетовое окрашивание, а в щелочном — зеленое, в переходной стадии, при pH 5,5, индикатор бесцветен; селеновый катализатор — готовят растиранием и смешиванием 100 г сульфата калия, 10 г сульфата меди и 2 г селена; 33%-ный раствор технической щелочи.

**Техника определения.** Навеску исследуемого вещества от 0,1 до 2 г (берут с таким расчетом, чтобы в ней содержалось от 20 до 40 мг азота) взвешивают на аналитических весах, переносят в сухую колбу Кильдаля, следя за тем, чтобы вещество не осталось на горлышке колбы (при определении азота не в сухом веществе, а в растворе он вносится в колбу пипеткой таким образом, чтобы пипетка не касалась горла колбы). Затем в колбу добавляют 20 см<sup>3</sup> концентрированной химически чистой серной кислоты и катализатор (0,5—1,0 г). Содержимое колбы встряхивают в течение 5—7 мин, обращая внимание на то, чтобы на стенках не оставалось комочеков вещества. Затем колбу ставят на нагревательный прибор в вытяжном шкафу, закрыв ее воронкой или специальным шаровидным затвором. Колбу устанавливают в наклонном положении во избежание выбрасывания содержимого во время кипения. Нагревание ведут сначала на маленьком пламени при частом перемешивании содержимого колбы, при этом происходит обугливание вещества и смесь пузырится с выделением SO<sub>3</sub>.

Раствор в колбе нагревают до полного осветления жидкости. Сжигание считают законченным, когда исчезнут все твердые обуглившиеся частицы навески, раствор станет прозрачным и в присутствии сульфата меди приобретет светло-зеленую окраску.

После сжигания смеси колбе дают остывть, приливают в нее небольшое количество воды и затем вместе с промывными водами осторожно переносят содержимое в перегонную колбу I, входящую в прибор для отгонки азота (рис. 1). Объем жидкости в колбе доводят до 300—350 см<sup>3</sup> и закрывают ее пробкой.

В делительную воронку наливают 80 см<sup>3</sup> 33%-ного раствора NaOH (из расчета 4 см<sup>3</sup> раствора NaOH на

каждый 1 см<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, взятый на сжигание), в приемную колбу наливают 20—25 см<sup>3</sup> 0,1 н. раствора серной кислоты и 2—3 капли метилового красного. Необходимо следить, чтобы трубка холодильника была опущена в раствор, налитый в приемную колбу для улавливания выделяющегося аммиака.

Раствор NaOH выливают из делительной воронки в перегонную колбу и начинают нагревание. Когда в приемник перегонится  $\frac{2}{3}$  всей жидкости, находящейся в колбе, отгон заканчивают, поднимают конец трубки холодильника, дают стечь последним каплям жидкости, обмывают трубку дистиллированной водой, выключают нагрев. Избыток H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в приемнике оттитровывают 0,1 н. раствором NaOH. Разница между количеством кислоты, налитой в приемник, и щелочи, израсходованной на титрование, покажет количество серной кислоты, связанной аммиаком. По этой разности вычисляют содержание азота, зная, что количество серной кислоты, содержащейся в 1 см<sup>3</sup> 0,1 н. раствора, эквивалентно 0,0014 г азота.

Содержание азота  $C_N$  (в %) вычисляют по уравнению

$$C_N = 0,0014 (V_k T_k - V_{щ} T_{щ}) 100 : a = 0,14 (V_k T_k - V_{щ} T_{щ}) : a,$$

где  $V_k$  — объем 0,1 н. раствора кислоты, налитый в приемник, см<sup>3</sup>;  $V_{щ}$  — объем 0,1 н. раствора щелочи, пошедший на обратное титрование, см<sup>3</sup>;  $T_k$ ,  $T_{щ}$  — титры соответственно кислоты и щелочи;  $a$  — навеска исследуемого вещества, г.

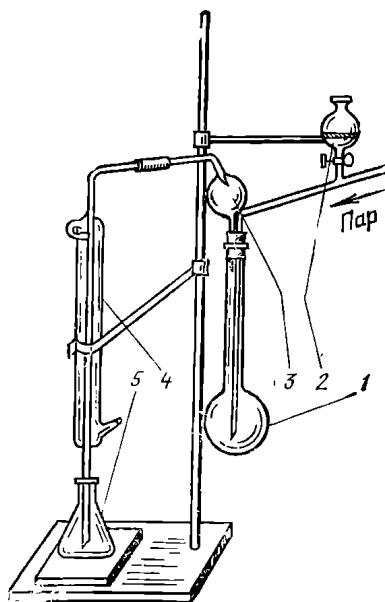


Рис. 1. Прибор для определения азота по Кильдалю:

1 — перегонная колба; 2 — делительная воронка; 3 — каплеуловитель; 4 — холодильник; 5 — приемная колба

При анализе следует ставить контрольный опыт на применяемые реагенты и делать поправку при расчете основного определения. Для этого берут то же количество реагентов, что и в опыте, за исключением навески исследуемого материала.

Для пересчета на белковые вещества найденное значение содержания азота умножают на коэффициент 6,25, условно принимая азот за белковый. Величина этого коэффициента определена, исходя из среднего содержания азота в белках 16% ( $K = 100 : 16 = 6,25$ ).

#### ПОЛУМИКРОМЕТОД

Метод применим для быстрого определения содержания малых количеств азота.

**Необходимые реагенты.** Используются те же реагенты, что и при определении азота по Кельдалю.

**Техника определения.** Точную навеску исследуемого вещества, содержащую 4—5 мг азота, помещают в колбу Кельдаля на 50 см<sup>3</sup>, прибавляют 1 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты и 0,3—0,5 г смеси сульфата меди и сульфата калия в соотношении 1:3. Сжигание проводят так же, как и при определении содержания общего азота по Кельдалю.

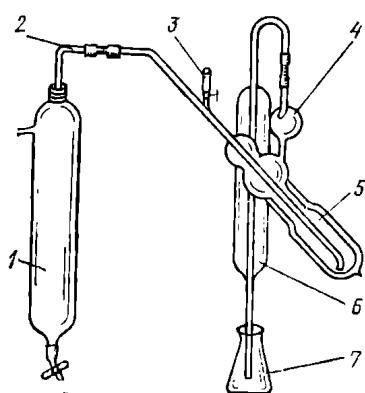


Рис. 2. Прибор Парнаса — Вагнера:

1 — сосуд для стока пробы (парообразователь); 2 — изогнутая трубка; 3 — воронка; 4 — каплеуловитель; 5 — основной сосуд; 6 — ходильник; 7 — приемная колба

После сжигания и охлаждения смеси в остывшую колбу приливают 4—5 см<sup>3</sup> воды и отгоняют аммиак в приборе модификации Парнаса — Вагнера (рис. 2).

Перед началом определения прибор в собранном виде пропаривают 15—20 мин. Жидкость из колбы Кельдаля через воронку переносят в сосуд 5. Колбу несколько раз ополаскивают небольшими порциями воды, которые сливают в этот же сосуд. К содержимому основного сосуда через воронку приливают 7 см<sup>3</sup> 33%-ного раствора NaOH (из рас-

чата 7 см<sup>3</sup> на 1 см<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), также смывая воронку небольшими количествами воды. Общий объем жидкости в сосуде не должен превышать 50 см<sup>3</sup>. Необходимо следить, чтобы трубка холодильника была опущена в приемную колбу с 5—15 см<sup>3</sup> (в зависимости от предполагаемого содержания азота) 0,05—0,1 н. раствора серной или соляной кислоты.

Отгонку аммиака ведут, пропуская пар через сосуд в реакционную жидкость. Этот сосуд служит для создания вакуума и регулирования давления пара и тем самым позволяет промывать и отсасывать отработавшие и промывные воды.

Отгонка заканчивается за 10—15 мин. После этого приемную колбу опускают и, чтобы обмыть трубку холодильника внутри, продолжают перегонку еще 2 мин. Снаружи трубку также обмывают водой, которую собирают в ту же колбу. Избыток кислоты оттитровывают из микробюrette раствором щелочи той же концентрации, что и кислоты.

По окончании анализа открывают зажим, сообщающий сосуд с атмосферой, и закрывают на несколько секунд зажим, соединяющий прибор с парообразователем. Благодаря более быстрому охлаждению сосуда 1 образуется вакуум и вся жидкость из сосуда 5 перетекает в сосуд 1. После промывания прибор готов к новому определению.

Содержание азота рассчитывается по той же формуле, что и при определении по Кельдалю.

**Установление нормальности H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.** Точную нормальность приготовленного 0,1 н. раствора серной кислоты удобно устанавливать по перекристаллизованной буре (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O).

Для определения титра серной кислоты в колбы помещают навески буры (0,18—0,20) ± 0,0001 г, приливают 50 см<sup>3</sup> горячей дистиллированной воды и несколько капель смешанного индикатора. Смесь титруют 0,1 н. раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до появления малиновой окраски. Титр кислоты  $T$  устанавливают по следующей формуле:  $T = a \cdot 1000 / (190,61 b)$ , где  $a$  — навеска буры, г;  $b$  — количество H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, пошедшой на титрование, см<sup>3</sup>.

**Примечание.** Титр серной кислоты и щелочи необходимо устанавливать для каждого вновь приготовленных растворов.

## Определение белка в материалах и пробах

### Метод лоури

Метод основан на реакции белков с реагентом Фолина, дающей синее окрашивание. Метод применяют для определения в растворах белка с концентрацией от 10 до 100 мкг.

**Необходимые реагенты.** Раствор А — 2%-ный раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0,1 н. растворе  $\text{NaOH}$ ; раствор В — 0,3%-ный раствор  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1%-ном растворе двузамещенного виннокислого натрия или калия; раствор С — опытный раствор, готовят в день определения (годен в течение одного дня), смешивая 50 мл раствора А и 1 мл раствора В; реагент Фолина — 100 г вольфрамата натрия ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) и 25 г молибдата натрия ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) растворяют в 700 см<sup>3</sup> воды, добавляют 50 см<sup>3</sup> 85%-ного раствора ортофосфорной и 100 см<sup>3</sup> соляной кислот. Смесь кипятят в течение 10 ч с обратным холодильником в вытяжном шкафу. После этого в колбу добавляют 150 г сульфата лития, 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 5 капель бромной воды. Смесь кипятят 15 мин в вытяжном шкафу для удаления избытка брома, охлаждают и доводят до 1 дм<sup>3</sup>. Реагент фильтруют и хранят в темной склянке с притертой пробкой. Раствор должен быть ярко-желтого цвета. Раствор можно хранить длительное время; раствор Д — реагент Фолина, разбавленный водой в соотношении 1 : 1.

**Техника определения.** К 0,4 см<sup>3</sup> раствора белка добавляют 2 см<sup>3</sup> раствора С. Смесь перемешивают и через 10 мин приливают к ней 0,2 см<sup>3</sup> рабочего раствора Фолина. Интенсивность окраски определяют на ФЭК-М с красным светофильтром (или на спектрофотометре при длине волны 750 нм) через 30 мин. Количество белка находят по калибровочной кривой.

Для построения калибровочной кривой 100 мг чистого белка (сывороточного γ-глобулина, кристаллического альбумина и т. п.) растворяют в 100 см<sup>3</sup> 0,1 н. раствора  $\text{NaOH}$  (1 см<sup>3</sup> содержит 1 мг белка). В 9 мерных колб на 100 см<sup>3</sup> приливают раствор белка в возрастающих количествах: 0,5 см<sup>3</sup>, а затем от 1 до 8 см<sup>3</sup>. Раствор в колбах доводят водой до метки, перемешивают и из каждой колбы берут по 0,4 см<sup>3</sup> для определения концентрации белка колориметрическим методом. По полученным данным вычерчивают калибровочную кривую.

## БИУРЕТОВЫЙ МИКРОМЕТОД ПО ЯРОШ

Метод используется для определения в растворах белков с концентрацией от 0,04 до 1,6 мг/см<sup>3</sup>.

**Необходимые реагенты.** Биуретовый реагент — в мерную колбу на 1 дм<sup>3</sup> наливают 400 см<sup>3</sup> 0,2 н. раствора NaOH, добавляют 9 г калия-натрия виннокислого, перемешивают до полного растворения, добавляют 3 г сульфата меди (порошка) и 5 г йодистого калия, объем доводят до метки 0,2 н. раствором NaOH; раствор мочевины — к 300 г мочевины (карбамида) прибавляют кусочек тимола величиной с горошину, приливают 700 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и смесь нагревают, затем прибавляют 3 г активного угля, тщательно перемешивают и фильтруют в мерную колбу на 1 дм<sup>3</sup>; объем доводят до метки дистиллированной водой.

**Техника определения.** В пробирку наливают 2,4 см<sup>3</sup> раствора мочевины, 0,1 см<sup>3</sup> раствора белка и 2,5 см<sup>3</sup> биуретового реагента. Смесь хорошо перемешивают и пробирки помещают в водянную баню или в термостат при 40°C на 10 мин. Затем их охлаждают до 20°C. Через 30 мин после добавления биуретового реагента раствор колориметрируют на ФЭК-М при длине волн 545 нм. Количество белка находят по калибровочной кривой, составленной по яичному альбумину.

Для построения калибровочной кривой готовят исходные водные растворы с содержанием 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 и т. д. мг белка в 10 см<sup>3</sup>. Из полученных растворов отбирают в пробирки по 0,1 см<sup>3</sup>, добавляют 2,4 см<sup>3</sup> раствора мочевины и 2,5 см<sup>3</sup> биуретового раствора и ведут определение описанным выше методом.

## Определение белкового азота по Барнштейну

Метод основан на денатурировании и осаждении белков из водных растворов с последующим определением выделенного азота по Кельдалю.

**Необходимые реагенты.** 6%-ный раствор сульфата меди ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ); 1,25%-ный раствор NaOH; 5%-ный раствор хлорида бария.

**Техника определения.** 1—2 г мелко размолотого вещества помещают в химический стакан на 100—150 см<sup>3</sup>, размешивают в 50 см<sup>3</sup> горячей дистиллированной воды и нагревают до кипения. Затем приливают 25 см<sup>3</sup> 6%-

ного раствора  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , смесь размешивают и добавляют 25 см<sup>3</sup> 1,25%-ного раствора  $\text{NaOH}$ . Раствору дают постоять не менее 1 ч для полного осаждения осадка, а затем сливают декантацией. Осадок, остающийся на фильтре, многократно (не менее 10—12 раз) промывают кипящей дистиллированной водой, сливая каждый раз промывную воду на фильтр. Промывание продолжают до прекращения появления мути в промывных водах от прибавления 10 капель 5%-ного раствора хлорида бария. Промытый осадок подсушивают вместе с фильтром на воронке в термостате, завертывают в сухую фильтровальную бумагу и, сжигая в колбе Кельдаля, определяют содержание в нем азота.

Осаждение белка можно проводить и другими соединениями, в частности трихлоруксусной кислотой. Дальнейшее определение ведут, как описано выше.

Разность между содержанием общего азота и белкового составит небелковый азот пробы (азот аммиака, аминов и аминокислот).

### Определение азота аммиака

Метод, разработанный Ивановым, основан на количественном определении аммиака, отгоняемого из испытуемой жидкости, подщелоченной известковым молоком, в условиях вакуума при низкой температуре.

**Необходимые реактивы.** Известковое молоко; 0,1 н. раствор серной кислоты; 0,1 н. раствор  $\text{NaOH}$ .

**Техника определения.** Анализ проводится в специальном приборе, состоящем из двух колб Вюрца: перегонной вместимостью 1,0—1,5 дм<sup>3</sup> и приемной вместимостью 0,65 дм<sup>3</sup>. В перегонную колбу Вюрца глубоко вставляется делительная воронка с краном. Отводная трубка перегонной колбы соединяется с помощью резиновой пробки с приемником так, чтобы ее конец был погружен в жидкость. Отводная трубка приемной колбы присоединяется к водоструйному насосу через предохранительную склянку и манометр.

Фильтрат после осаждения белка или вытяжку в количестве 30 см<sup>3</sup> наливают в перегонную колбу Вюрца. Для уменьшения толчков при кипении в колбу бросают несколько кусочков пемзы. Колбу плотно закрывают пробкой, в которую вставлена делительная воронка с

хорошо пришлифованным краном и длинной трубкой, кончающейся над уровнем жидкости. Через воронку в колбу приливают 20—30 см<sup>3</sup> хорошо прокипяченного и охлажденного известкового молока до щелочной реакции (устанавливается по лакмусовой бумажке). В приемную колбу наливают точное количество (20—30 дм<sup>3</sup>) 0,1 н. раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Затем включают вакуум-насос и, обеспечив снижение давления до 15—20 мм рт. ст., приступают к перегонке. Для этого перегонную колбу помещают в водяную баню, температуру которой поддерживают на уровне 40°C, а приемную колбу охлаждают льдом или струей воды.

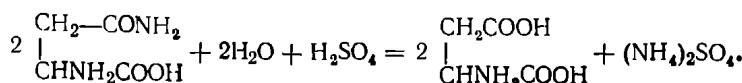
Для уменьшения вспенивания перегоняемой жидкости и ускорения процесса перегонки аммиака из делительной воронки в перегонную колбу несколько раз приливают по каплям по 3—4 см<sup>3</sup> этилового спирта. Перегонку ведут почти до полного выпаривания жидкости в течение 30—40 мин.

По окончании отгона закрывают зажим между водоструйным насосом и предохранительной склянкой и осторожно открывают кран делительной воронки. Когда давление выравнивается, прибор разбирают, вынимая сначала пробку из перегонной колбы, а затем из колбы приемника, и тщательно промывают отводную трубку перегонной колбы; находившуюся в кислоте промывную воду собирают в приемную колбу. Избыток H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> оттитровывают 0,1 н. раствором NaOH в присутствии индикатора.

Содержание азота аммиака  $C_{\text{аз.а}}$  (в г на 100 см<sup>3</sup>) вычисляют по следующей формуле:  $C_{\text{аз.а}} = 0,014(a-b)100 : 50 = 0,028(a-b)$ , где  $a$  — количество 0,1 н. раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в приемной колбе, см<sup>3</sup>;  $b$  — количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, см<sup>3</sup>.

### Определение амидного азота

Метод основан на способности амидов кислот выделять аммиак при нагревании с разбавленными кислотами. Реакция протекает по уравнению



**Необходимые реагенты.** Известковое молоко; 0,1 н. раствор  $H_2SO_4$ ; 0,1 н. раствор  $NaOH$ ; концентрированная серная или соляная кислота.

**Техника определения.** К 100 см<sup>3</sup> раствора (после осаждения из него белков) прибавляют 5 см<sup>3</sup> концентрированной соляной или 2,0—2,5 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты и кипятят в течение 1,0—1,5 ч в колбе с обратным холодильником. После охлаждения жидкость нейтрализуют до слабокислой реакции раствором  $NaOH$  и определяют в ней азот аммиака (см. с. 12). В качестве контроля определяют азот аммиака без предварительного гидролиза кислотой. Умножая количество найденного аммиака на коэффициент 10,42, вычисляют количество амидного азота.

### Определение азота аминокислот

**МЕТОД, ОСНОВАННЫЙ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧИСЛА КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП В ВОДНО-СПИРТОВЫХ РАСТВОРАХ**

По этому методу число карбоксильных групп аминокислот и полипептидов определяется по результатам титрования проб раствором щелочи. Данным методом можно определить до 99% аминокислот от их общего количества в водно-спиртовых растворах.

**Необходимые реагенты.** 96%-ный этиловый спирт; 0,1 н. раствор  $KOH$ ; раствор тимолфталеина (0,1 г в 125 см<sup>3</sup> этилового спирта).

**Техника определения.** К 5 см<sup>3</sup> водного раствора гидролизата белка прибавляют 50 см<sup>3</sup> этилового спирта, 4—5 капель тимолфталеина и титруют 0,1 н. раствором  $KOH$  до появления синего окрашивания.

Параллельно ведут титрование контрольной пробы (вода, спирт, тимолфталеин) до появления такого же оттенка, как в опытной пробе.

Разность объемов раствора  $KOH$ , пошедших на титрование опытной и контрольной проб, умножают на титр щелочи по азоту и получают количество азота в пробе.

### Иодометрический метод

Метод основан на способности аминокислот и различных пептидов образовывать комплексные растворимые соединения с медью, которая определяется йодо-