

Федеральное агентство по образованию

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Санкт-Петербургский государственный технологический университет  
растительных полимеров»

---

Кафедра комплексной химической переработки древесины

# **ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

## **Часть 2**

### **Методические указания к лабораторным работам**

Факультет - химико-технологический

Специальности: 240100 – Химическая технология и биотехнология  
240401 – Химическая технология органических веществ  
240406 – Технология химической переработки  
древесины  
240501 – Химическая технология высокомолекулярных  
соединений

Санкт - Петербург  
2009

УДК 579.22

Основы биотехнологии: методические указания к лабораторным работам / сост. А.В. Буров, Р.Г. Алиев, Е.А. Павлова, Э.П. Терентьева, Н.К. Удовенко; ГОУВПО СПбГТУ РП. - СПб., 2009. Ч.2. - 18 с.

В настоящие методические указания вошли две лабораторные работы по биотехнологии, по определению активности агентов. Кроме того, представлены краткие теоретические сведения, а также даны примеры расчетов и графических построений. В приложениях указаны методики приготовления рабочих растворов и некоторые аналитические методы исследования.

Предназначены для студентов специальностей 240100, 240401, 240406, и 240501.

Рецензент: зав. отделом производства пищевых растительных белков и биотехнологии ВНИИЖ,  
канд. техн. наук, доцент М. Л. Доморощенко

Подготовлены и рекомендованы к печати кафедрой комплексной химической переработки древесины Санкт-Петербургского государственного технологического университета растительных полимеров (протокол № 3 от 15.04.09 г.).

Утверждены к изданию методической комиссией химико-технологического факультета СПбГТУ РП (протокол № 5 от 29.04.09 г.).

технологический

© ГОУ ВПО Санкт-Петербургский  
государственный  
университет растительных

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время понятие биотехнологии включает в себя множество направлений деятельности. Это управляемое получение целевых продуктов с помощью биологических агентов и целенаправленное конструирование биологических агентов с применением геной и клеточной инженерии.

Определить, что такое биотехнология, нелегко, так как эта область широко интегрирует с такими отраслями науки и техники, как:

- молекулярная биология;
- генетика;
- геновая инженерия;
- биохимия;
- микробиология;
- физическая химия;
- химическая технология и другие.

Расширение сферы приложения биотехнологии приводит к поиску новых режимов и технологий проведения этих процессов, которые во многом зависят от свойств компонентов биотехнологической системы, в первую очередь – биологического агента (штамма), от требований, предъявляемых к продукту (от назначения продукта), и от технико-экономических показателей, которые необходимо достигнуть.

Основными компонентами биотехнологического процесса являются биологический агент, субстрат и технологический режим. Наличие этих компонентов предполагает получение целевого продукта.

В качестве биологических агентов могут выступать микроорганизмы, культуры клеток, комплексы ферментов и чистые ферменты.

Главное требование к субстрату – наличие источника углерода в легкоусвояемой форме, а также наличие элементов питания.

Технологический режим включает в себя все необходимые условия протекания процесса и его аппаратное оформление.

## 1. ОЦЕНКА ПРОДУКТИВНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Оценить продуктивность биотехнологического процесса можно с помощью таких параметров, как:

- $q_s$  – удельная скорость потребления субстрата;
- $q_p$  – удельная скорость образования продукта.

В предложенной лабораторной работе физиологическая активность дрожжей определяется с учетом этих параметров.



## 1.1. Определение физиологической активности дрожжей при спиртовом брожении

### Введение

В работе определяется физиологическая активность дрожжей при спиртовом брожении. К дрожжам относят, так называемые, одноклеточные грибы, т.е. грибные организмы, проводящие большую часть своего жизненного цикла в виде отдельных клеток. Эти микроорганизмы представляют собой факультативные анаэробы, т. е. активно развиваясь в аэробных условиях, они способны существовать и в средах без молекулярного кислорода, переходя для восполнения энергетических затрат с дыхания на брожение. Дрожжи способны к спиртовому брожению, в ходе которого молекулы гексоз – моносахаридов с шестью атомами углерода расщепляются с образованием этанола:



Физиологическая активность культуры микроорганизмов измеряется массой питательных веществ, потребляемых единицей микробной биомассы за единицу времени (или же массой образующихся продуктов). В случае работы с дрожжами этот показатель обычно называют «бродильной активностью» или «бродильной энергией». Таким образом, физиологическую активность микроорганизмов можно оценивать по удельной скорости потребления субстрата ( $q_s$ ) или по удельной скорости образования продукта ( $q_p$ ):

$$q_s = (S_0 - S_1)/X(\tau_1 - \tau_0); \quad q_p = (P_1 - P_0)/X(\tau_1 - \tau_0),$$

где:  $X$  – концентрация микроорганизмов, кг/м<sup>3</sup>;

$S_0$  и  $S_1$  – концентрации субстрата в момент времени  $\tau_0$  и  $\tau_1$ , соответственно, кг/м<sup>3</sup>;

$P_0$  и  $P_1$  – концентрации продукта в момент времени  $\tau_0$  и  $\tau_1$ , соответственно, кг/см<sup>3</sup>.

Следует отметить некоторые особенности используемой методики определения физиологической активности. Режим брожения периодический. Дрожжи помещают в определенный объем питательной среды, в котором популяция дрожжей проходит стадии своего развития. Следовательно, характеристики биомассы, в том числе и физиологическая активность, будут меняться в процессе брожения. В самом начале из-за имеющегося в питательной среде растворенного кислорода условия будут аэробными. Однако растворимость кислорода в воде очень мала, и уже через несколько минут основная масса кислорода будет израсходована дрожжами, и условия станут, близки к анаэробным.

Некоторая часть субстрата расходуется дрожжами в структурном обмене для размножения, роста клеток и восполнения внутриклеточных структур. Все это приводит к тому, что значение физиологической активности дрожжей по удельной скорости потребления глюкозы будет больше значения физиологической активности по удельной скорости образования диоксида углерода в сопоставимых единицах. Удельная скорость потребления глюкозы будет определять общую физиологическую активность, тогда как удельная скорость образования  $\text{CO}_2$  – физиологическую активность дрожжей в процессе брожения.

Для исследования физиологической активности дрожжей используется газометрическая установка (рис. 1). Процесс брожения осуществляется в круглодонной колбе с двумя горловинами в термостатируемых условиях (30 С). Измеряя объем выделяющегося диоксида углерода за определенные промежутки времени, можно рассчитать удельную скорость образования продукта. В качестве питательной среды применяется водный раствор D-глюкозы. Определяя изменение концентрации раствора в процессе брожения, рассчитывают удельную скорость потребления субстрата.

**Газометрическая установка.**

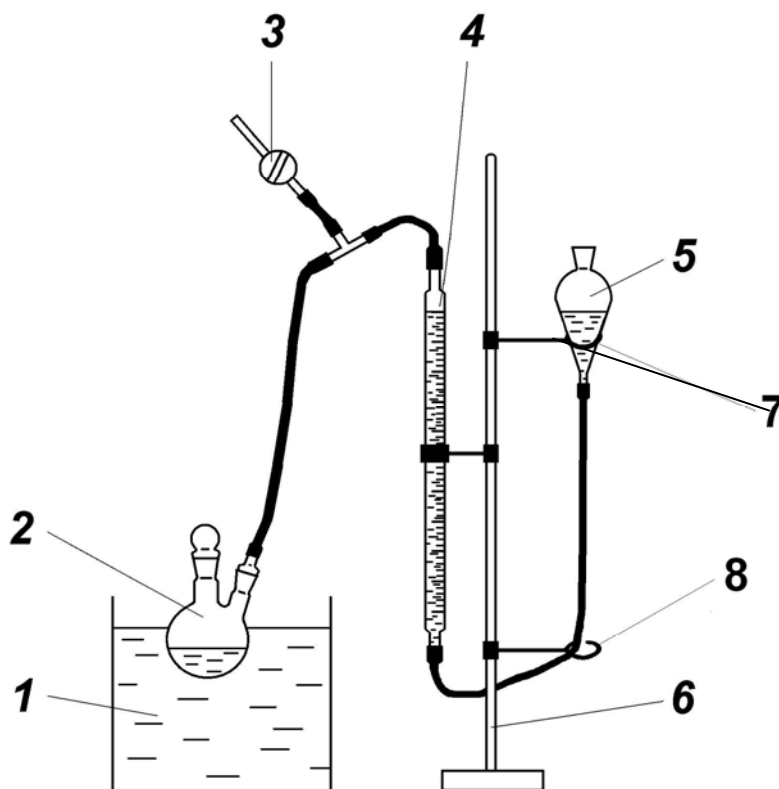


Рис. 1. Газометрическая установка: 1 – водяной термостат; 2 – двугорлая колба; 3 – одноходовой кран; 4 – бюретка; 5 – уравнильный сосуд; 6 – штатив; 7 – верхнее кольцо; 8 – нижнее кольцо

### ХОД РАБОТЫ

В двугорлую колбу (2) вместимостью 50 см<sup>3</sup> через широкую горловину помещают навеску прессованных дрожжей (с влажностью 75%) и приливают 30 см<sup>3</sup> водного раствора глюкозы (исходную концентрацию раствора глюкозы определяют рефрактометрически – см. приложение). Колбу закрывают стеклянной пробкой вращательным движением, притирая шлифовое соединение. (Плохо притертая пробка будет пропускать газ или ее может выбросить под давлением газа.) Затем закрывают одноходовой кран (3) и опускают уравнильный сосуд (5) с верхнего кольца (7) на нижнее кольцо (8). При этом в колбе создается разрежение, ускоряющее переход в бюретку (4) образующегося в реакции CO<sub>2</sub>.

Определение объема выделившегося газа проводят каждые 20 минут. После каждого замера объема CO<sub>2</sub> проводят уравнивание жидкостей в бюретке и уравнильном сосуде. Для этого поднимают уравнильный сосуд в верхнее кольцо и, открыв одноходовой кран, выводят уровень жидкости в бюретке на нулевую отметку. Снова закрывают кран и опускают уравнильный сосуд в нижнее кольцо.\* Результаты измерений записывают в таблицу 1.

Таблица 1. Газовыделение при спиртовом брожении

Период времени, сек.	0...1200	1200...2400	2400...3600	3600...4800
Объем CO <sub>2</sub> , м <sup>3</sup>				

### Обработка экспериментальных данных

Плотность CO<sub>2</sub> (ρ) в лабораторных условиях принимается равной 1,8 кг/м<sup>3</sup>.

Рассчитываем массу CO<sub>2</sub> в килограммах выделившегося в каждый период времени:

$$m_{CO_2} = \rho \cdot V_{CO_2}, \text{ (кг CO}_2\text{)}$$

\* Примечание.

Бюретка и уравнильный сосуд заполняются 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, т. к. в кислоте снижается растворимость CO<sub>2</sub>.

Рассчитываем концентрацию биомассы с учетом влажности дрожжей

$$X = m \cdot (1 - W) / 30 \cdot 10^{-6} \text{ кг биомассы/м}^3;$$

где,  $m$  – масса прессованных дрожжей, кг;

$W$  – влажность дрожжей равная 75%.

Определяем для каждого периода времени удельную скорость образования  $\text{CO}_2$  ( $q_{\text{CO}_2}$ ):

$$q_{\text{CO}_2} = P_{\text{CO}_2} / X \cdot \tau \text{ [кг CO}_2\text{/кг биомассы} \cdot \text{с]},$$

По полученным результатам строим график зависимости удельной скорости образования  $\text{CO}_2$  от времени брожения (рис. 2).



Рис. 2. Изменение удельной скорости образования  $\text{CO}_2$  при брожении

Удельную скорость потребления субстрата за весь период брожения определяют по изменению концентрации раствора глюкозы, которую контролируют рефрактометрически.

Массовую долю глюкозы, оставшейся в культуральной жидкости после брожения ( $C_K$ ) определяют, предварительно профильтровав эту жидкость для удаления дрожжевых клеток.

Рассчитываем удельную скорость потребления глюкозы ( $q_G$ , кг глюкозы/кг биомассы · с):

$$q_G = (C_0 - C_K) \cdot \rho_P \cdot / 100 \cdot X \cdot t ,$$

где:  $\rho_P$  – плотность раствора глюкозы ( $\rho_P \approx 1040 \text{ кг/м}^3$ );

$t$  – общее время брожения, с.

Для сопоставления общей физиологической активности и активности в процессе брожения необходимо выразить  $q_G$  и  $q_{\text{CO}_2}$  в одинаковых единицах. По уравнению спиртового брожения моль глюкозы образует 2 моля диоксида углерода, т.е. из 180 кг глюкозы получается 88 кг  $\text{CO}_2$ .

Следовательно, для перевода  $q_G$  в единицы  $q_{\text{CO}_2}$  можно воспользоваться уравнением:

$$q_{\text{CO}_2} = q_G \cdot 88/180 , \text{ кг CO}_2\text{/кг биомассы} \cdot \text{с}$$

Полученный результат следует сопоставить со средней удельной скоростью образования  $\text{CO}_2$  за весь период брожения.



### Пример.

Для проведения эксперимента была взята навеска прессованных дрожжей равная 2 г. За 1200 сек объем, выделившегося  $\text{CO}_2$  составил  $40 \text{ см}^3$

Рассчитываем массу выделившегося  $\text{CO}_2$  в килограммах:

$$m_{\text{CO}_2} = \rho \cdot V_{\text{CO}_2} = 1,8 \cdot 40 \cdot 10^{-6} = 72 \cdot 10^{-6} \quad (\text{кг CO}_2).$$

Рассчитываем массу выделившегося газа на единицу объема раствора:

$$P_{\text{CO}_2} = m_{\text{CO}_2}/30 = 72 \cdot 10^{-6}/30 \cdot 10^{-6} = 2,4 \quad (\text{кг CO}_2/\text{м}^3).$$

Рассчитываем концентрацию биомассы на единицу объема раствора с учетом влажности дрожжей

$$X = m \cdot (1 - W)/30 \cdot 10^{-6} = 2 \cdot 10^{-3} \cdot (1 - 0,75)/30 \cdot 10^{-6} = 16,7 \quad (\text{кг биомассы}/\text{м}^3).$$

Определяем для каждого периода времени удельную скорость образования  $\text{CO}_2$  ( $q_{\text{CO}_2}$ ):

$$q_{\text{CO}_2} = P_{\text{CO}_2}/X \cdot \tau = 2,4/16,7 \cdot 1200 = 0,12 \cdot 10^{-3} \quad [\text{кг CO}_2/\text{кг биомассы} \cdot \text{с}]$$

Начальная концентрация глюкозы составила 10,2%, конечная – 4,9%.

Рассчитываем удельную скорость потребления глюкозы ( $q_{\text{Г}}$ , кг глюкозы/кг биомассы · с):

$$q_{\text{Г}} = (C_0 - C_{\text{К}}) \cdot \rho_{\text{Р}} / 100 \cdot X \cdot t = (10,2 - 4,9) \cdot 1040/100 \cdot 16,7 \cdot 6000 = 0,55 \cdot 10^{-3} \quad (\text{кг глюкозы}/\text{кг биомассы} \cdot \text{с}).$$

$$q_{\text{CO}_2} = q_{\text{Г}} \cdot 88/180 = 0,55 \cdot 10^{-3} \cdot 88/180 = 0,26 \cdot 10^{-3} \quad (\text{кг CO}_2/\text{кг биомассы}).$$

### Приложение.

Рефрактометрия – метод анализа, основанный на измерении показателя преломления. Относительный показатель преломления ( $n$ ) представляет собой отношение скорости света в воздухе к скорости света в исследуемой среде. Его можно представить как отношение синусов угла падения света на поверхность раздела двух сред ( $\alpha$ ) и угла преломления света ( $\beta$ ) (рис. 3,а). Он не зависит от угла падения света, но зависит от длины волны света и от температуры. Поэтому показатель преломления измеряют при монохроматическом свете и постоянной температуре, которые указываются в виде индексов при показателе преломления, например  $n_D^{20}$  означает, что измерение проводили при длине волны 589,3 нм (желтый цвет линии натрия) и 20 °С.

Показатель преломления измеряют на рефрактометрах, из которых наиболее распространенным является рефрактометр типа Аббе, работающий на принципе измерения предельного угла преломления. Главным узлом рефрактометров этого типа является призмный блок (рис. 3,б). Блок состоит из двух призм 1 и 2, на горизонтальную поверхность между которыми помещают исследуемую жидкость 3. Одна

из призм осветительная. Ее поверхность, контактирующая с жидкостью, сделана матовой для рассеивания света. Пройдя через эту призму, свет попадает в исследуемый раствор и на границе между раствором и гранью измерительной (рефрактометрической) призмы преломляется. Преломленный луч направляют в зрительную трубку, где находится система линз и призма Амичи 4. Призма Амичи уничтожает дисперсию луча света и позволяет использовать обычное освещение вместо источника монохроматического света. Она склеена из трех призм, выполненных из разных сортов стекла. На линзу окуляра 6 нанесено перекрестье, соответствующее оси зрительной

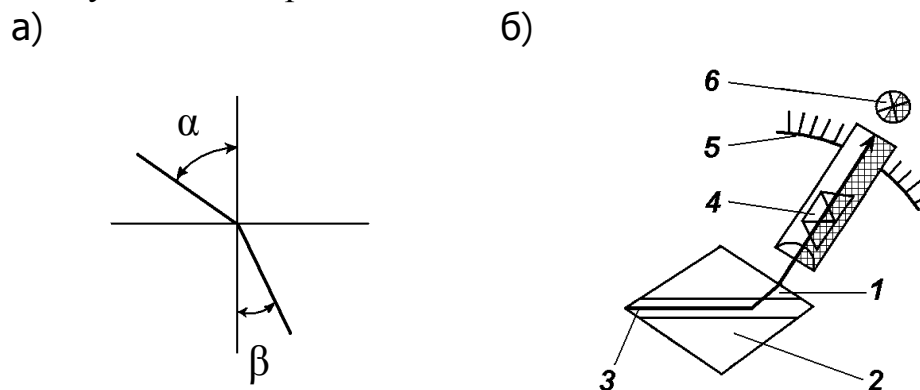


Рис. 3. Принцип рефрактометрических измерений (а) и схема рефрактометра Аббе (б): 1,2 – призмы; 3 – исследуемая жидкость; 4 – призма Амичи; 5 – шкала рефрактометра; 6 – линза окуляра

трубки. Поворотом призмы или зрительной трубки вокруг оси призмы совмещают оптическую ось с предельным углом преломления, видимым как граница света и тени. С поворачиваемым блоком связана шкала рефрактометра 5.

При работе с растворами измеряют показатель преломления раствора ( $n_p$ ), а затем показатель преломления растворителя ( $n_0$ ), который вычитают из показателя преломления раствора. Концентрацию раствора ( $C$ , %) рассчитывают по калибровочному графику, по таблицам значений показателей преломления для различных концентраций данного раствора или по рефрактометрическому фактору ( $F$ ). В последнем случае пользуются формулой:  $C = (n_p - n_0)/F$ . Аналитический рефрактометрический фактор определяется экспериментально и равен увеличению показателя преломления при повышении концентрации на 1 %.

рассчитывают по калибровочному графику, по таблицам значений показателей преломления для различных концентраций данного раствора или по рефрактометрическому фактору ( $F$ ). В последнем случае пользуются формулой:  $C = (n_p - n_0)/F$ . Аналитический рефрактометрический фактор определяется экспериментально и равен увеличению показателя преломления при повышении концентрации на 1 %.

В данной работе используется рефрактометр, отградуированный по концентрации водного раствора сахарозы. В окуляре рефрактометра видны два светлых окошка (рис. 4): верхнее с перекрестьем и нижнее с двумя

шкалами. Верхняя шкала для определения показателя преломления, нижняя – для определения процентной концентрации раствора. Перед измерением открывают осветительное оконце над верхней призмой (осветительной) и отводят оправу с этой призмой вверх до отказа. Далее обязательно очищают поверхности осветительной и измерительной линз мягкой тряпочкой, смоченной спиртом или дистиллированной водой. В последнем случае тщательно промокают (не протирают!) воду фильтровальной бумагой. Затем круглой стеклянной палочкой или пипеткой наносят на измерительную плоскость рефрактометрической линзы (нижняя линза) несколько капель исследуемого раствора так, чтобы после закрытия призм вся измерительная плоскость была покрыта жидкостью. Следует при этом избегать прикосновения пальцами к измерительной плоскости и испытуемой

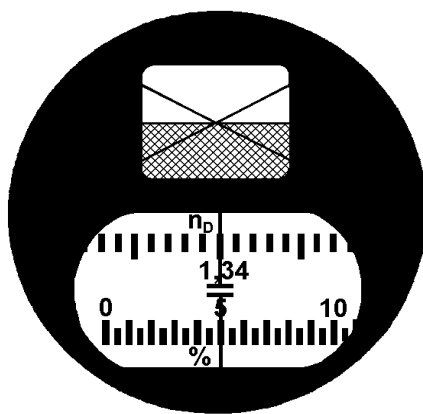


Рис. 4. Вид поля зрения в окуляре рефрактометра.

жидкости. Опускают прикрывающую осветительную призму и прижимают ее к измерительной плоскости несколько секунд для выравнивания температур жидкости и призм. Устанавливают рефрактометр осветительным оконцем в направлении самого интенсивного источника света. Вращением цилиндрических ручек с накаткой получают резкое, четкое бесцветное разграничение светлого и темного полей в поле зрения окуляра. Вращая левую ручку с накаткой, наводят граничную линию точно на середину перекрестия в верхнем оконце окуляра (см. рис. 4). Вертикальная линия в нижнем оконце показывает в этот момент значение показателя преломления на верхней шкале ( $n_D$ ) и процентную концентрацию раствора на нижней шкале.

## 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ФЕРМЕНТАХ

Еще в глубокой древности человек использовал некоторые ферментативные процессы, не понимая их сущности. Давно было известно, как готовить хлеб, вино и сыр, как обрабатывать кожу и получать льняное волокно. В основе получения этих и многих других продуктов лежат ферментативные реакции.

Сегодня мы знаем, что ферменты катализируют миллионы химических превращений в клетках животных, растений, микроорганизмов и воздействуют на соответствующие субстраты вне клетки.

Ферменты – это вещества белкового происхождения, способные ускорять протекание химических реакций. Такое название происходит от латинского слова *fermentare* – вызывать брожение. А связано оно с тем, что впервые, ферменты были выделены из бродильной жидкости и их деятельность вначале связывали именно с брожением.

Все ферменты по своему строению можно объединить в две группы:

1. простые белки;
2. сложные белки.

Первую группу представляют белковые молекулы, не связанные с другими соединениями.

Вторую группу составляют белки, химически связанные с небелковой частью фермента. Эту часть называют простетической группой, или коферментом. «Партнерами» белка по ферменту могут быть витамины, а также сахара, нуклеотиды и другие соединения.

Ферменты обладают уникальной способностью «узнавать» и связывать строго определенный *субстрат*.

*Субстратом* называют то химическое соединение, превращение которого ускоряют ферменты. В этом проявляется *специфичность* деятельности ферментов.

Зависимость каталитической активности от *температуры* – еще одно замечательное свойство ферментов. Температурный оптимум большинства ферментов лежит в интервале от 40 до 50 °С. Однако есть среди них и «теплолюбивые» катализаторы (70 – 90 °С), и ферменты, явно предпочитающие низкую температуру (5 – 7 °С).

На деятельность ферментов большое влияние оказывают различные химические соединения. Одни соединения повышают активность ферментов, их называют *активаторами*. Нередко в роли активаторов выступают ионы металлов.

Другие химические соединения тормозят действие ферментов, их называют *ингибиторами*. В роли ингибиторов могут оказаться как органические соединения, так и неорганические, например, соли тяжелых металлов (ртути, свинца и др.).

В настоящее время описано более 2000 ферментов. Молекулярная масса ферментов от 15 тысяч до миллиона и выше.

По характеру катализируемых реакций ферменты делят на шесть основных классов: *оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы*.

Ферменты синтезируются, как все белки, на рибосомах и локализуются в цитоплазме и в различных субструктурах, встроенных в мембраны; находятся на поверхности клетки или в окружающей клетку среде.

Ферменты животного происхождения преимущественно выделяют из органов животных (печени, сердца и других).

Из ферментов растительного происхождения наиболее широко в народном хозяйстве используют амилазы и папаин. Условно ферментным препаратом можно назвать и ячменный солод, в котором содержится до 1% амилаз. Из растительного сырья получают также фосфатазы, пероксидазы, уреазы, гемицеллюлазы.

Совершенно иная ситуация с получением биологически активных веществ, в том числе ферментов, микробиологическим путем. Современные методы генетики и генетической инженерии позволяют целенаправленно увеличить выход необходимого фермента. Кроме того, среди микроорганизмов можно найти формы, живущие в экстремальных условиях (термофилы, галлофилы и другие). Это означает, что из микроорганизмов можно выделить ферменты с улучшенными свойствами – термостабильные, осмоустойчивые, кислото- и щелочеустойчивые.

Ферменты прочно заняли видное место в жизни человека. Они находят широкое использование в медицине и ветеринарии, в молочной, хлебопекарной, спиртовой промышленности и в пивоварении, в кожевенном и меховом производстве, в бытовой химии и других областях.

Далее представлена лабораторная работа, для которой фермент получен из растительной ткани методом экстракции.

## Лабораторная работа № 2

### Определение каталитической активности фермента каталазы

#### Введение

Ферменты – биокатализаторы.

В биотехнологии используют ферменты, выделенные из живых тканей. Это могут быть хорошо очищенные индивидуальные ферменты для проведения определенной реакции, либо комплекс ферментов для осуществления превращения субстрата в результате последовательности химических реакций. В последнем случае значительно облегчается процедура получения биологического агента, так как это могут быть всего лишь дезинтегрированные клетки, содержащие требуемый набор ферментов.

В работе исследуется активность каталазы в растительных тканях. Активность каталазы определяют на водных экстрактах предварительно дезинтегрированных тканей картофеля.

Каталаза – фермент, ответственный за разложение в живых тканях пероксида водорода по реакции



Разложение пероксида водорода можно контролировать либо по выделению кислорода, либо по изменению концентрации раствора пероксида.

Эффективность биологического агента оценивается по удельной каталитической активности. Удельную каталитическую активность рассчитывают как скорость превращения субстрата на единицу массы фермента.

При определении активности каталазы в серии экспериментов, например, для различных растительных тканей, необходимо использовать одну и ту же концентрацию пероксида водорода в реакционной смеси. Следовательно, при заданном объеме реакционной среды в нее должно вноситься одно и то же количество пероксида. Поскольку пероксид водорода при хранении разлагается, перед проведением эксперимента определяют его концентрацию (см. приложение).

В работе для измерения объема выделяющегося кислорода используется газометрическая установка (рис. 1), в которой разложение пероксида водорода происходит в круглодонной колбе с двумя горловинами. Процесс протекает в термостатируемых условиях.

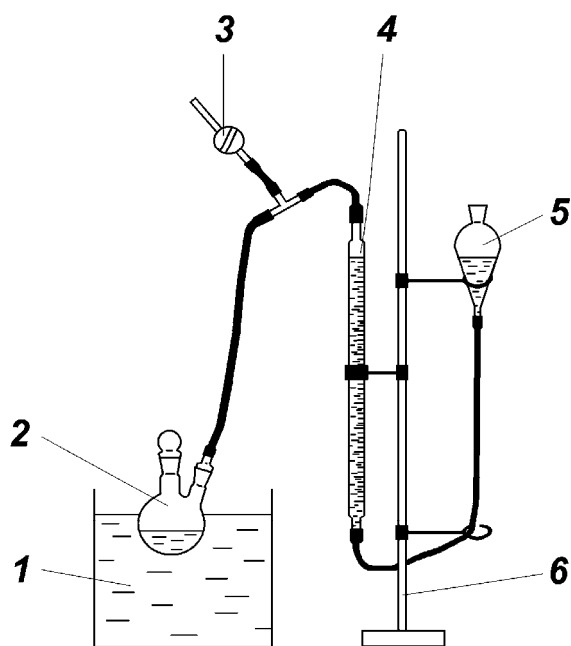


Рис. 1. Газометрическая установка: 1 – водяной термостат; 2 – реакционная колба; 3 – двухходовой кран; 4 – бюретка; 5 – уравнильный сосуд; 6 – штатив

### Ход работы

В реакционную колбу через широкую горловину вносят  $10 \text{ см}^3$  экстракта каталазы. Затем разбавляют экстракт таким количеством дистиллированной воды, чтобы общий объем реакционной смеси после добавления рассчитанного объема раствора пероксида ( $V_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ) (см. приложение) составил  $25 \text{ см}^3$ . Раствор пероксида приливают к реакционной смеси последним и колбу сразу же закрывают стеклянной пробкой вращательным движением, притирая шлифовое соединение. Плохо притертая пробка будет пропускать газ, и, кроме того, ее может выбросить под давлением газа. Затем закрывают двухходовой кран и опускают уравнильный сосуд на нижнее кольцо. При этом в колбе создается разрежение, снижающее растворимость газа и ускоряющее переход образующегося  $\text{O}_2$  из жидкой фазы в газовую.

Определение объема выделяющегося газа проводят каждые 3 мин. Результаты измерений записывают в таблицу.

## Газовыделение при разложении пероксида водорода каталазой

Время, мин	3	6	9	12	15	18		
Объем O <sub>2</sub> , см <sup>3</sup>								

Замеры останавливают, когда разница в изменении объема газа становится меньше 0,1 см<sup>3</sup>. Данные по кинетике газовыделения изображают на графике (рис. 2).

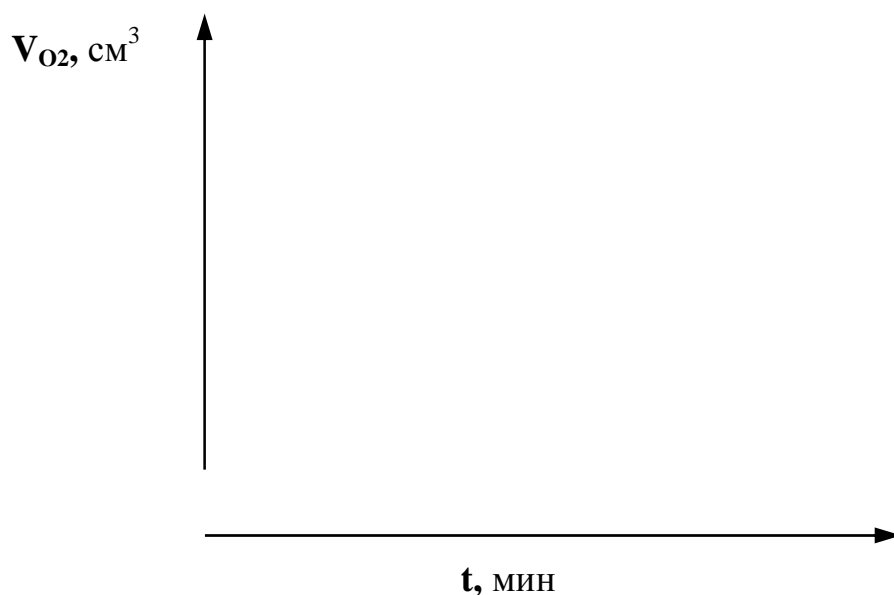


Рис. 2. Кинетика газовыделения при разложении пероксида водорода каталазой

В работе разложение пероксида дополнительно контролируется по его остаточной концентрации в реакционной смеси ( $C_K$ ) (см. приложение).

По остаточной концентрации пероксида водорода рассчитывают массу разложившегося пероксида ( $m_{H_2O_2}$ ):

$$m_{H_2O_2} = V_{H_2O_2} \cdot C_0 - 25 \cdot C_K, \text{ г.} \quad (2)$$

Определяют, сколько должно было выделиться кислорода при разложении этого количества пероксида:

$$V_{O_2} = 357,3 \cdot m_{H_2O_2}. \quad (3)$$

**Сопоставьте значение  $V_{O_2}$  с результатом газометрического определения.**

**Объясните возможное расхождение результатов.**

Количество разложившегося пероксида рассчитывают по объему выделившегося кислорода  $V_{O_2}$ :



$$n_{\text{H}_2\text{O}_2} = 10^6 \cdot V_{\text{O}_2} / (357,3 \cdot 34), \text{ мкмоль.} \quad (4)$$

Оценку каталитической активности фермента каталазы производят по удельной каталитической активности водного экстракта:

$$A_y = n_{\text{H}_2\text{O}_2} / (t \cdot 10), \text{ мкмоль}/(\text{мин} \cdot \text{см}^3), \quad (5)$$

где  $n_{\text{H}_2\text{O}_2}$  – количество разложившегося пероксида водорода, мкмоль;

$t$  – время, мин;

10 – объем водного экстракта,  $\text{см}^3$ .

Удельную каталитическую активность вычисляют для первых 10 мин эксперимента и среднюю – за все время эксперимента. Объем  $\text{O}_2$  за первые 10 мин определяют по графику (рис. 2).

**Дайте объяснение значительному снижению каталитической активности фермента со временем.**

**Примечание:** Обратите внимание, что для упрощения снятия показаний расчетные величины ( $\text{г}/\text{см}^3$ ) даны не в системе СИ. Необходимо представить конечные результаты в системе СИ ( $\text{кг}/\text{м}^3$ ).

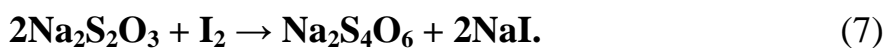
## Приложение

Определение концентрации раствора пероксида проводится с использованием иодометрии. Иодометрия – метод титриметрического анализа, основанный на определении количества иода, которое затрачивается на окисление восстановителей или выделяется при взаимодействии окислителя с раствором иодида калия. Преимуществами метода являются возможность проводить иодометрические определения в широком интервале кислотности раствора (рН 2...10) и высокая точность установления точки эквивалентности. Последнее связано с наличием чувствительного специфического индикатора на иод. В качестве индикатора применяют раствор крахмала, образующего с иодом интенсивно окрашенное адсорбционное соединение. Реакция отличается высокой чувствительностью – уже  $0,00001 \text{ M}$  растворы иода окрашиваются в присутствии крахмала в синий цвет.

Пероксид водорода в кислой среде окисляет иодид калия:



Выделившийся иод оттитровывают рабочим раствором тиосульфата натрия, который реагирует с иодом с образованием тетраионата натрия по уравнению:



**Внимание!** Поскольку иод и его растворы обладают летучестью, **все процедуры, связанные с выделением иода, необходимо проводить в закрытых сосудах.** Кроме того, иод плохо растворяется в воде, поэтому для растворения выделяющегося при реакции твердого иода и уменьшения его летучести в растворе создают большой избыток иодида калия (в 3...4 раза больше необходимого для взаимодействия с пероксидом). Ионы иода в растворе также необходимы для образования окрашенного соединения с крахмалом, так как сам молекулярный иод не дает такого соединения. Однако иодид калия на свету окисляется кислородом воздуха с выделением иода, поэтому **обработку раствора пероксида водорода иодидом проводят в темноте. Титровать иод раствором тиосульфата следует в два этапа: сначала без индикатора, затем с индикатором.** Это делается для максимально возможного уменьшения времени контакта крахмала с иодом, так как иод может расходоваться на побочную реакцию окисления крахмала. К тому же в кислой среде крахмал постепенно гидролизует, что также может быть причиной погрешности анализа.

### **Определение концентрации и объема раствора пероксида водорода**

В колбу со шлифом вместимостью 250 см<sup>3</sup> наливают 30 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, добавляют 10 см<sup>3</sup> 10%-го раствора KI и 5 см<sup>3</sup> 1моль/дм<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Пипеткой отбирают 1 см<sup>3</sup> раствора пероксида водорода и также переносят в колбу. Затем колбу закрывают притертой пробкой и помещают в темное место. Через 30 мин содержимое колбы титруют 0,1 моль/дм<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> до появления светло-желтой окраски раствора. Затем добавляют 1...2 капли раствора крахмала и продолжают титрование до исчезновения синего окрашивания. Расчет массовой концентрации исходного раствора пероксида водорода проводят по формуле:

$$C_0 = 0,0017 \cdot A, \text{ г/см}^3, \quad (8)$$

где A – объем децинормального раствора тиосульфата натрия,

пошедший на титрование, см<sup>3</sup>;

0,0017 – коэффициент, соответствующий условному титру  
раствора тиосульфата по пероксиду, г.

**Требуемый для эксперимента объем раствора пероксида водорода (V<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>) определяют, исходя из объема газа, который можно измерить на газометрической установке. При полном разложении 1 г H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в соответствии с уравнением (1) объем выделяющегося кислорода в лабораторных условиях (температура 20 °С) составит 357,3 см<sup>3</sup>. Для**

проведения лабораторной работы можно ограничиться массой  $\text{H}_2\text{O}_2$  количеством 0,2 г, выделяющих  $71,5 \text{ см}^3$  кислорода. Тогда объем пероксида водорода составит:

$$V_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,2/C_0, \text{ см}^3. \quad (9)$$

Определение конечной концентрации перекиси делают вышеописанным способом сразу же после завершения эксперимента, но раствора иодида калия берут  $5 \text{ см}^3$ , а серной кислоты –  $1 \text{ см}^3$ , время выдержки смеси в темноте сокращают до 5 мин. Для титрования используют  $0,01 \text{ моль/дм}^3$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , соответственно коэффициент в уравнении для расчета остаточной концентрации  $C_k$  будет равен 0,00017.

$$C_k = 0,00017 \cdot A, \text{ г/см}^3. \quad (10)$$

### **Получение водных экстрактов дезинтегрированных тканей картофеля**

Процедура измельчения растительной ткани и получения экстракта зависит от типа растительной ткани. При исследовании клубней картофеля, например, сначала готовится болтушка. 20 г свежечищенного картофеля измельчаются в лабораторном дезинтеграторе до получения однородной массы. Массу из дезинтегратора, предварительно разбавив ее  $100 \text{ см}^3$  дистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу на  $500 \text{ см}^3$ . Ополаскивают рабочую емкость дезинтегратора дистиллированной водой, сливая ее в мерную колбу. Затем объем жидкости в колбе доводят водой до метки и помещают колбу на лабораторную качалку. После 3...4 часов встряхивания полученную болтушку фильтруют или центрифугируют для получения прозрачного экстракта. В работе желательно использовать свежеприготовленный экстракт. При необходимости допускается хранение экстракта в холодильнике.

### **Библиографический список**

- Беккер М. Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е. П. Биотехнология. – М.: Агропромиздат, 1990.
- Виестур У. Э., Шмите И.А., Жилевич А.В. Биотехнология: Биологические агенты, технология, аппаратура. – Рига: Зинатне, 1987.
- Шапиро Я. С. Биологическая химия. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004.

### **Содержание**

Введение.....	3
1.Оценка продуктивности биотехнологического процесса.....	-
Лабораторная работа № 1. Определение физиологической активности дрожжей при спиртовом брожении.....	4

Приложение.....	8
2. Общие сведения о ферментах.....	11
Лабораторная работа № 2. Определение каталитической активности фермента каталазы.....	13
Приложение.....	16
Библиографический список.....	18

Эльвира Петровна Терентьева  
**Нина Константиновна Удовенко**  
Елена Анатольевна Павлова  
Ризо Гуламович Алиев

Основы химии целлюлозы и древесины  
Учебно-методическое пособие

Редактор и корректор  
Техн. редактор Л.Я.Титова

---

Подп. к печати                      Формат 60x84/16. Бумага тип. № 1.  
Печать офсетная.            уч.-изд. л.,            усл. печ. л. Тираж 100 экз.  
Изд. №            Цена «С». Заказ

---

Ризограф ГОУ ВПО Санкт-Петербургского государственного  
технологического университета растительных полимеров, 198095, СПб.,  
ул. Ивана Черных, 4.