

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Институт морских биологических исследований
им. А. О. Ковалевского

Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н., Нехорошев М. В.

**Количественное определение
массовой доли суммарных белков в воздушно-сухой
биомассе микроводорослей методом Лоури**

Учебно-методическое пособие

Севастополь, 2017

УДК 582.232:577.112:57.083

ББК 28.591.4я73

Г–27

Р е ц е н з е н т: заведующий отделом физиологии животных и биохимии
ФГБУН ИМБИ, доктор биологических наук, профессор
А. А. Солдатов

Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н., Нехорошев М. В.

Количественное определение массовой доли суммарных белков в воздушно-сухой биомассе микроводорослей методом Лоури : учебно-методическое пособие / РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского. — Севастополь, 2017. — 43 с. — (Препринт / РАН, ИМБИ).

В настоящем учебно-методическом пособии представлена подробная инструкция по измерению массовой доли белка в биомассе микроводорослей методом Лоури. Уделено внимание возможным ошибкам при хранении проб, при пробоподготовке и измерениях. Указаны оптимальные условия для экстракции и измерений белка, а также освещены ограничения применимости метода Лоури. В заключительной части пособия представлены инструкции по приготовлению реагента Фолина-Чокальтеу и по измерению его нормальной концентрации.

Пособие адресовано аспирантам и студентам всех специальностей.

Утверждено к публикации Учёным советом
ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского»
(протокол №12 от 18.12.2017 г.)

© Р. Г. Геворгиз, С. Н. Железнова, М. В. Нехорошев, 2017

© ФГБУН ИМБИ, 2017

Область применения

Процедура описывает методику, которая позволяет определить концентрацию общего белка в биомассе микроводорослей по методу Лоури [14]. Описание методики сделано на примере цианобактерии *Spirulina (Arthrospira) platensis*, но оно также вполне применимо для других представителей низших фототрофов. Методика используется в экспериментальной работе при исследовании процессов биосинтеза в интенсивной и экстенсивной культуре низших фототрофов. Описанная методика применима как для биомассы микроводорослей, выращенных в лабораторных условиях, так и для биомассы, полученной при промышленном производстве.

Термины и определения

Сухая масса водорослей — масса навески микроводорослей после высушивания до постоянного веса при температуре 105 °С в течение 24 часов¹.

Воздушно-сухая масса водорослей — масса навески микроводорослей после высушивания до постоянного веса при температуре 35–60 °С в течение 6–12 часов. Обычно высушивают биомассу на полиэтиленовой плёнке до остаточной влажности 1–15%.

Белок (протеин, полипептид) — органическое соединение, которое состоит из аминокислотных остатков, соединённых между собой пептидными связями. Пептидная связь образуется в результате взаимодействия α -аминогруппы ($-\text{NH}_2$) одной аминокислоты с α -карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) другой аминокислоты. Белки подразделяют на два класса: простые и сложные. Простые белки при гидролизе расщепляются на аминокислоты, а сложные — на аминокислоты и другие органические и неорганические продукты.

Биуретовая реакция — качественная реакция на все без исключения белки, а также продукты их неполного гидролиза, которые содержат не менее двух пептидных связей. Биуретовая реакция обусловлена присутствием в белках пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с сульфатом меди (II) окрашенные медные солеобразные комплексы. Биуретовую реакцию дают также некоторые небелковые вещества, например биурет ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$), оксамид ($\text{NH}_2\text{CO-CO-NH}_2$), ряд аминокислот (гистидин, серин, треонин, аспарагин).

¹ В публикациях по микроводорослям иногда вместо термина «сухая масса» используются термины «абсолютно сухая масса водорослей» или «абсолютно сухой вес», которые по сути являются синонимами.

Принцип метода

Метод Лоури основан на двух различных реакциях [8]. Первая реакция состоит в образовании комплекса меди с амидными (пептидными) связями, с последующим восстановлением меди в щелочных условиях. Полученный продукт называется *биуретовым хромофором*, который стабилизируется добавлением тартрата [13]. Вторая реакция — восстановление реагента Фолина-Чокальтеу комплексом восстановленной меди (полученным в первой реакции) с амидными связями, а также с аминокислотными остатками тирозина и триптофана [12]. Реагент Фолина-Чокальтеу в восстановленном виде имеет синий (фиолетовый) цвет, поэтому детектируется спектрофотометрически (см. рисунок 1). По интенсивности окраски раствора определяют концентрацию белков [14].

Чувствительность метода 2 мкг/мл. Пределы определяемых концентраций от 5 до 500 мкг/мл [2].

Недостатки метода

Метод Лоури требует больше времени, чем другие методы определения белка. Кроме того, корректному определению мешают детергенты, углеводы, глицерин, трицин, ЭДТА, трис, соли калия, сульфгидрильные соединения, дисульфиды, фенолы, гуанин, ксантин, ионы магния и кальция [8]. Многие из этих

Таблица 1. Допустимые концентрации наиболее часто используемых химических веществ при определении белка по методу Лоури [8].

Вещество	Концентрация	Вещество	Концентрация
ТХУ	<1,25 %	Сульфат аммония	>28 мМ
Цитрат	2,5 мМ	Глицин	2,5 мМ
HEPES	2,5 мкМ	Фосфат	250 мМ
Трис	250 мМ	Тритон X-100	0,25 %
ДДС-Na	1,25 %	Дезоксихолат	625 мкг/мл
Твин 20	0,10 %	2-Меркаптоэтанол	1,8 мкМ
ДТТ	50 мкМ	Нуклеиновые кислоты	0,2 мг
ДМСО	>6,2 %	ЭДТА	125 мкМ
Глицерин	25 %	KCl	30 мМ

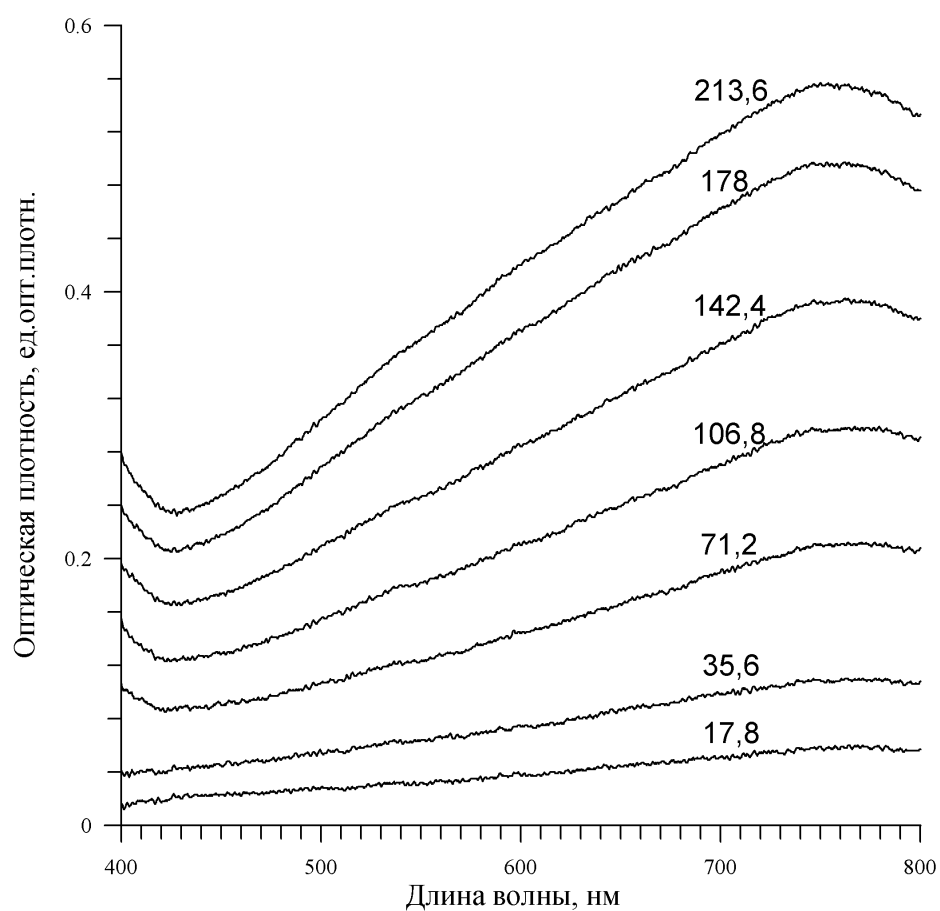


Рис. 1. Спектр поглощения восстановленного реагента Фолина-Чокальтеу комплексом меди с пептидными связями белка. Цифры указывают концентрацию белка в растворе в мкг/мл [2, 14].

веществ используются в подготовке белковых проб и это является одним из ограничений применения метода Лоури (см. таблицу 1).

Метод Лоури неприменим для измерения содержания гидрофобных белков или белков мембранных фракций². Метод Лоури также чувствителен к изменениям в содержании аминокислотных остатков тирозина и триптофана.

В связи с ограничениями метода Лоури при определении концентрации белка в воздушно-сухой биомассе микроводорослей следует учитывать вероятность присутствия в пробе солей культуральной жидкости. Особенно важно это для проб, полученных из стационарной фазы роста, поскольку чем больше культура находилась в стационарной фазе роста, тем сложнее биомассу отделить от культуральной жидкости. При неполном отделении биомассы от культуральной жидкости или недостаточно промытой биомассы от культуральной среды в пробе могут присутствовать соли, вследствие чего метод Лоури будет давать некорректные (обычно заниженные) значения концентрации белка.

Оборудование

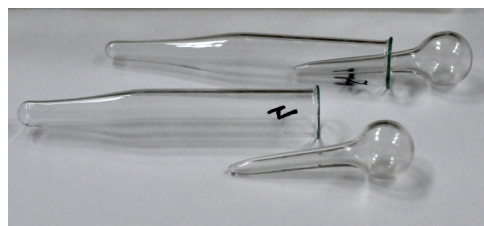
1. Автоматически регистрирующий спектрофотометр. Спектральный диапазон 400–800 нм, с кюветами в 1 см.
2. Центрифуга лабораторная. Фактор разделения 1500–5000 g.
3. Весы аналитические с погрешностью измерений до 0,0002 г.
4. Весы аналитические, предельная нагрузка 200 г, погрешность измерений до $\pm 0,001$ г.
5. Сушильный шкаф, диапазон температур 20–150 °С.
6. Аналитические стеклянные пипетки объёмом 1–5 мл и 100–1000 мкл с резиновой грушей или пипетатором (фингером) поршневым либо дозаторы объёмом 1–5 мл и 100–1000 мкл.
7. Водяная баня, рабочая температура 100 °С.
8. Фарфоровая или агатовая ступка с пестиком.

Замечание. Рекомендуемые модели приборов приведены в [Приложении В](#).

²Для определения гидрофобных белков и белков мембранных фракций используют метод Смита [15].

Посуда

1. Мерная колба объёмом 50 мл, абсолютная погрешность $\pm 0,05$ мл.
2. Пробирки стеклянные центрифужные объёмом 10 мл 15 штук. Для исключения испарения воды из пробирки при гидролизе используют специальные крышки-кипелки.
3. Мерный цилиндр объёмом 100 мл с абсолютной погрешностью $\pm 0,5$ мл.
4. Мерный цилиндр объёмом 20 мл с абсолютной погрешностью $\pm 0,2$ мл.
5. Стакан химический объёмом 100 мл, 5 шт.
6. Стеклянная палочка.



Подготовка посуды

Вся посуда тщательно моется с помощью щётки пищевой содой и промывается дистиллированной водой. Посуда высушивается в сушильном шкафу. В работе используется только сухая посуда.

Реактивы

1. Медный купорос ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) х. ч. или ч. д. а.
2. Тартрат калия или натрия (соответственно калиевая или натриевая соль винной кислоты $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) х.ч. или ч. д. а. Также можно использовать соль тартрат калия-натрия $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Вместо тартрата можно использовать цитрат натрия (натриевую соль лимонной кислоты $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) х. ч. или ч. д. а.
3. Карбонат натрия (Na_2CO_3) х. ч. или ч. д. а.
4. Гидроксид натрия (NaOH) х. ч. или ч. д. а.
5. 1 н реактив Фолина-Чокальтеу (порядок приготовления реактива см. в [Приложениях А и Б](#)).
6. Кристаллический альбумин ЧСА (человеческий сывороточный альбумин) фармацевтический или альбумин фирмы Merck.

7. Вода дистиллированная.
8. Этиловый спирт 96%-ный для промывки кювет.

Подготовка реактивов

Комплексный реактив для определения белка.

1. **Раствор А:** 2%-ный карбонат натрия в 0,1 н гидроксиде натрия. Т. е. 0,4 г гидроксида натрия растворить³ в 100 мл дистиллированной воды (0,1 н раствор щёлочи). Затем в небольшом количестве 0,1 н щёлочи растворить 2 г карбоната натрия и после растворения довести объём до 100 мл тем же раствором щёлочи.
2. **Раствор В:** 0,5%-ный медный купорос в 1%-ном тартрате натрия или калия (или в 1%-ном цитрате натрия). Т. е. 1 г тартрата натрия или калия (или 1 г цитрата натрия) растворить в 40 мл дистиллированной воды. Затем 0,5 г медного купороса растворить в 40 мл дистиллированной воды. После полного растворения объединить растворы и довести водой до 100 мл. Полученный раствор должен быть прозрачным.
3. **Раствор С:** перед анализом смешать 50 мл реактива А и 1 мл реактива В. Раствор С хранению не подлежит.
4. **Раствор D:** перед использованием реактив Фолина-Чокальтеу разбавить дистиллированной водой до кислотности, соответствующей 1 н раствору соляной кислоты (обычно 1:1, см. Приложение Б) [9]. Разбавленный реактив Фолина-Чокальтеу хранению не подлежит.

Замечание. Раствор А и В хранят в плотно закупоренных пластиковых ёмкостях в темноте при температуре 3–7 °С.

Градуировка и определение содержания по способу внешних стандартов. Построение калибровочной кривой

Для построения калибровочной кривой готовят исходный (маточный) водный раствор ЧСА. Для этого отмеряют 50 мл 0,1 н раствора NaOH с помощью мерной колбы, затем в стакане или колбе с широким горлом растворяют 25 мг

³Гидроксид натрия гигроскопичен, поэтому навеску делают в стеклянном стакане с минимальной затратой времени, чтобы погрешность, связанная с поглощением влаги из атмосферы, была минимальной.

ЧСА⁴ (объёмом, занимающим 25 мг ЧСА пренебрегают). Таким образом получают исходный раствор с концентрацией

$$\frac{25,0}{50,0} = 0,5 \text{ мг/мл} = 500 \text{ мкг/мл.}$$

Замечание. Брать навеску именно 25 мг нет необходимости. Концентрация исходного раствора может быть и другой, но желательно близкой к 500 мкг/мл. Обычно концентрация исходного раствора подбирается из соображения удобства использования имеющегося оборудования (дозаторов, пипеток и пр.).

Далее используют нижеследующую схему. Добавляя разный объём исходного раствора в пробирки, готовят растворы белка с известными концентрациями (стандарты):

$$V_{\text{мр}} + V_{H_2O} \Rightarrow C_{\text{ЧСА}},$$

где $C_{\text{ЧСА}}$ — заданная концентрация ЧСА, мкг/мл; $V_{\text{мр}}$ — аликвота исходного раствора, мкл; V_{H_2O} — объём воды, мкл.

Таким образом получают стандартные растворы с заданной концентрацией белка:

№ пробирки	$C_{\text{ЧСА}}$, мкг	$V_{\text{мр}}$, мкл	V_{H_2O} , мкл
1	50	100	900
2	100	200	800
3	150	300	700
4	200	400	600
5	250	500	500
6	300	600	400
7	400	800	200
Холостые пробы			
01	0	1000	1000
02	0	1000	1000
03	0	1000	1000

⁴ЧСА взвешивают на кальке на аналитических весах с точностью 0,0002 г. После перенесения ЧСА в колбу кальку со следами ЧСА взвешивают и по разнице весов определяют навеску ЧСА.

Определение содержания белка в стандартных растворах. В каждую пробирку со стандартным раствором добавляют 3 мл раствора **С**, перемешивают стеклянной палочкой⁵ и после 10 мин экспозиции при комнатной температуре добавляют 0,4 мл раствора **Д**, после чего интенсивно перемешивают стеклянной палочкой. Через 30 мин измеряют оптическую плотность на длине волны 750 нм в кювете в 1 см против дистиллированной воды⁶.

Полученные значения оптической плотности холостых проб усредняют и среднее значение вычитают из оптической плотности всех проб:

$$\Delta D = D_{750} - D_0 = D_{750} - \frac{D_{01} + D_{02} + D_{03}}{3}.$$

Результаты вносят в нижеследующую таблицу:

№ пробирки	$C_{\text{ЧСА}}$	ΔD	№ пробирки	$C_{\text{ЧСА}}$	ΔD
0	0		4	200	
1	50		5	250	
2	100		6	300	
3	150		7	400	

Построение калибровочной кривой. По данным таблицы строят экспериментальную зависимость оптической плотности ΔD от концентрации $C_{\text{ЧСА}}$. Затем по методу наименьших квадратов рассчитывают значение коэффициента K — тангенс угла наклона калибровочной кривой к оси абсцисс. Этот коэффициент необходим для определения белка в пробах с неизвестной концентрацией по оптической плотности ΔD (см. ниже формулу (1)).

Замечание. Поскольку наименьшая ошибка измерений оптической плотности лежит в области 0,4–0,5 ед. опт. плотн., эксперимент планировать лучше таким образом, чтобы середина калибровочной кривой попадала именно в этот диапазон.

Пример калибровочной кривой для концентрации белка в исходном растворе 35,6 мг ЧСА / 100 мл 0,1 н NaOH приведён на рисунке 2.

⁵Добавляют реактив **С**, начиная с пробирок с меньшими концентрациями белка. При использовании одной стеклянной палочки перемешивание начинают всегда с меньших концентраций. Рекомендуется отереть палочку фильтровальной бумагой перед каждым перемешиванием.

⁶Измерения можно проводить и против «средней» холостой пробы (разностная спектрофотометрия) [4].

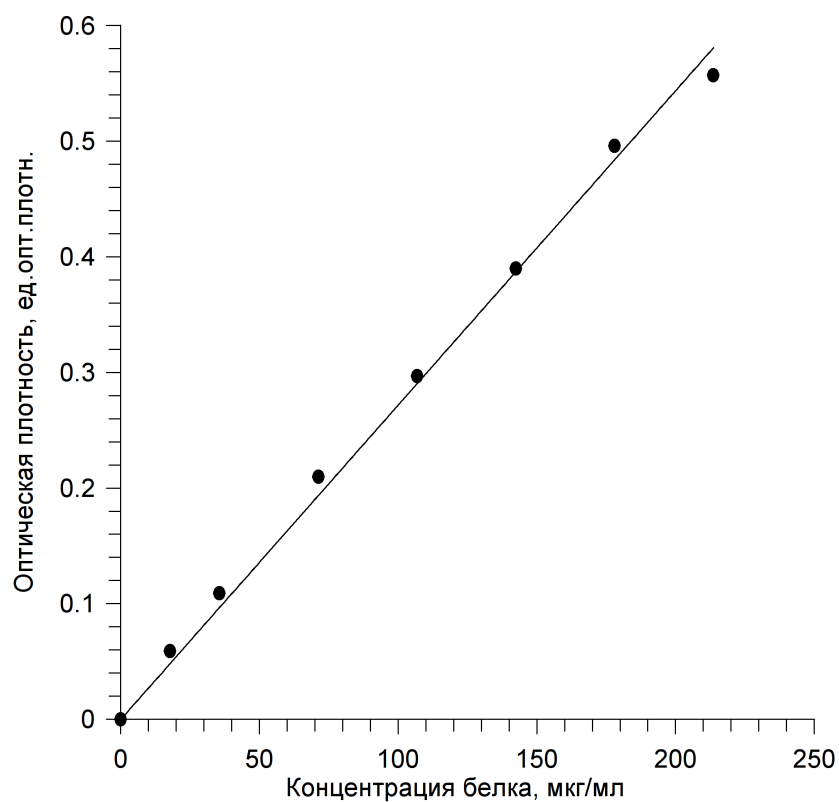


Рис. 2. Калибровочный график для определения белка в пробе при использовании 0,1 н щёлочи (концентрации белка в исходном растворе 356 мкг/мл (см. рисунок 3). $\Delta D_{750} = K \times C_{\text{ЧСА}} = 0,00272 \times C_{\text{ЧСА}}$, $1/K = 368$.

№ пробирки	$V_{\text{мр}}$, мл	V_{H_2O} , мл	$C_{\text{ЧСА}}$, мкг/мл	ΔD
1	0	1	0	0
2	0,05	0,95	17,8	0,059
3	0,1	0,9	35,6	0,109
4	0,2	0,8	71,2	0,21
5	0,3	0,7	106,8	0,297
6	0,4	0,6	142,4	0,39
7	0,5	0,5	178,0	0,496
8	0,6	0,4	213,6	0,557

Ход анализа проб

Отбор проб

Суспензию спирулины фильтруют через газ с ячейёй 40–100 мкм. Полученную таким образом сырую биомассу (пасту) промывают дистиллированной водой (1 объём пасты к 1 объёму воды). Промывают биомассу водой 3–4 раза⁷. Затем пасту наносят тонким слоем (2–3 мм) на полиэтилен и высушивают в течение 6–10 часов при температуре 35–60 °С до воздушно-сухого состояния (обычно до остаточной влажности 5–15 %).

Подготовка проб к анализу

1. **Подготовка пробирок.** Для статистической достоверности результата измерений белка в пробе используют 5–7 параллельных измерений. Поэтому требуется 5–7 центрифужных пробирок для щелочного гидролиза и 5–7 пробирок для непосредственного проведения реакции на белок. Кроме того, требуется минимум три пробирки для холостых проб. Пробирки заранее нумеруют.
2. **Подготовка проб к щелочному гидролизу.** Воздушно-сухую биомассу измельчают в агатовой ступке. Чем меньше будут частицы, тем лучше пройдёт процесс экстракции белка. Затем делают 5–7 навесок⁸ по 3–6 мг (с абсолютной погрешностью не более 0,2 мг) и помещают в заранее пронумерованные центрифужные пробирки для щелочного гидролиза. *Замечание.* Измельчённая биомасса не подлежит хранению, поскольку атмосферный кислород может приводить к деструкции белка. Также разрушение белка может наблюдаться при измельчении биомассы в условиях яркого освещения.

Определение содержания белка

1. **Подготовка щелочного гидролизата.** В каждую из пронумерованных центрифужных пробирок с навесками вносят по 3 мл 0,1 н раствора NaOH, перемешивают стеклянной палочкой и помещают на водяную

⁷ Объём воды подбирают таким образом, чтобы в сточной воде отсутствовали соли культуральной среды. Наличие солей в сточной воде можно определить посредством качественной реакции на ион карбоната CO_3^{2-} . Для этого в сточную воду добавляют 2%-ный раствор CaCl_2 . Если смесь становится мутной, значит, биомасса промыта недостаточно.

⁸ Взвешивают измельчённую биомассу на кальке. Поскольку на кальке остаются следы биомассы, кальку следует взвешивать после перенесения навески в пробирку.

баню на 5 минут (с момента закипания). Для исключения испарения воды пробирки закрывают крышками-кипелками.

2. После окончания щелочного гидролиза пробирки необходимо остудить и центрифугировать 3–5 мин при 1500–5000 g (3000–8000 об/мин).

Замечание. Спирулина должна практически полностью раствориться в щёлочи, в противном случае результат анализа может быть занижен из-за неполного извлечения белка из биомассы. Если биомасса по каким-либо причинам не растворяется в 0,1 н щёлочи, тогда используют 0,5 или 1 н раствор щёлочи, а также увеличивают время удержания проб на водяной бане до 10 минут⁹.

3. **Биуретовая реакция + реагент Фолина-Чокальтеу.** После центрифугирования из щелочного гидролизата берут аликвоту объёмом 0,2 мл и вносят в пробирку для непосредственного проведения реакции на белок. Затем добавляют 0,8 мл дистиллированной воды, таким образом суммарный объём аликвоты щелочного гидролизата и дистиллированной воды¹⁰ становится равным 1 мл. Далее приливают 3 мл раствора **С**, перемешивают и после 10 мин экспозиции при комнатной температуре добавляют 0,4 мл раствора **Д** и интенсивно перемешивают стеклянной палочкой. Через 30 мин измеряют оптическую плотность на длине волны 750 нм против дистиллированной воды.
4. **Холостая проба (контроль).** В центрифужные пробирки (3–4 штук) добавляют по 1 мл дистиллированной воды. Затем приливают 3 мл реактива **С**, перемешивают, после 10 мин экспозиции при комнатной температуре добавляют 0,4 мл реактива **Д** и интенсивно перемешивают стеклянной палочкой. Через 30 мин измеряют оптическую плотность на длине волны 750 нм против дистиллированной воды.
5. Полученные значения оптической плотности холостых проб усредняют, среднее значение вычитают из оптической плотности всех параллельных измерений:

$$\Delta D = D_{750} - D_0 = D_{750} - \frac{D_{01} + D_{02} + D_{03}}{3}.$$

⁹При этом необходимо для построения калибровки использовать 0,5 или 0,1 н раствор щёлочи соответственно (см. рисунок 3).

¹⁰Аликвоту щелочного гидролизата и воды (суммарный объём равен 1 мл) подбирают таким образом, чтобы значения оптической плотности попадали в рабочий диапазон спектрофотометра 0,2–0,8 ед. опт. плотн.

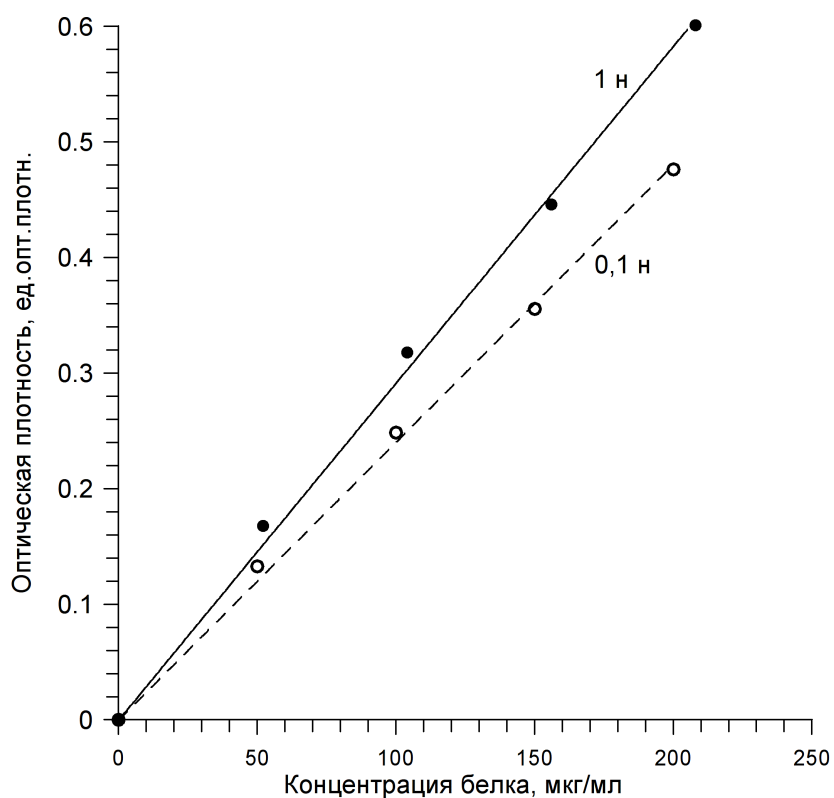


Рис. 3. Калибровочные графики для определения белка в пробе при использовании 1 н и 0,1 н раствора щёлочи (концентрация белка в исходном растворе для 1 н щёлочи 520 мкг/мл, для 0,1 н — 500 мкг/мл).

$$\Delta D_{750} = K_{1н} \times C_{\text{чСА}} = 0,00291 \times C_{\text{чСА}}, \quad 1/K_{1н} = 344.$$

$$\Delta D_{750} = K_{0,1н} \times C_{\text{чСА}} = 0,00240 \times C_{\text{чСА}}, \quad 1/K_{0,1н} = 417.$$

№ пробирки	$V_{\text{мр}}, \text{ мл}$	$V_{\text{H}_2\text{O}}, \text{ мл}$	1 н		0,1 н	
			$C_{\text{чСА}}, \text{ мкг/мл}$	ΔD	$C_{\text{чСА}}, \text{ мкг/мл}$	ΔD
1	0	1	0	0	0	0
2	0,1	0,9	52	0,193	50	0,133
3	0,2	0,8	104	0,318	100	0,249
4	0,3	0,7	156	0,446	150	0,356
5	0,4	0,6	208	0,601	200	0,477

Обработка результатов

Массовую долю воды в воздушно-сухой биомассе (k) рассчитывают по формуле:

$$k = \frac{m_{\text{навеска}} - m_{\text{асв}}}{m_{\text{навеска}}},$$

где $m_{\text{навеска}}$ — навеска воздушно-сухой биомассы, мг; $m_{\text{асв}}$ — навеска после высушивания до постоянного веса при 105 °С.

Массовую долю белка в пробе (C) в процентах, в пересчёте на сухую массу спирулины, вычисляют по формуле:

$$C = \Delta D \cdot \frac{1}{K} \cdot \frac{(V_{\text{аликвота}} + V_{\text{вода}}) \cdot \frac{V_{\text{гидролизат}}}{V_{\text{аликвота}}}}{1000 \cdot m(1 - k) \cdot l} \cdot 100\%; \quad (1)$$

$$[C] = \left[\frac{\frac{\text{МКГ} \cdot \text{СМ}}{\text{МЛ}} \cdot \frac{\frac{\text{МЛ} \cdot \frac{\text{МЛ}}{\text{МГ} \cdot \text{СМ}}}{\text{МЛ}} \cdot \%}{\text{МЛ}} \right] = [\%],$$

где $\Delta D = D_{\text{проба}} - D_{\text{контроль}}$ — оптическая плотность на длине волны 750 нм, ед. опт. плотн.; l — длина светового пути¹¹ (внутренняя длина измерительной кюветы), см; $V_{\text{аликвота}}$ — объём аликвоты щелочного гидролизата, мл; $V_{\text{вода}}$ — объём дистиллированной воды, добавленной к аликвоте щелочного гидролизата, мл; $V_{\text{гидролизат}}$ — объём щелочного гидролизата, мл; m — навеска воздушно-сухой массы водорослей, мг; k — доля воды в воздушно-сухой массе; K — коэффициент, равный тангенсу угла наклона калибровочной кривой к оси абсцисс, мл / (мкг·см). Пример расчёта приведён на рисунке 2, где $K = 0,00272$, $1/K = 368$ (мкг·см) / мл.

Комментарий к формуле (1).

Приведённая выше формула для расчёта белка дана в общем виде. Но на практике её записывают более компактно, поскольку некоторые части формулы (1) можно опустить.

Отметим следующее:

1. Произведение $\Delta D \cdot \frac{1}{K}$ на основании калибровочной кривой позволяет определить концентрацию белка в рабочем растворе, мкг/мл.
2. Сумма $(V_{\text{аликвота}} + V_{\text{вода}})$ определяет рабочий объём раствора, который обычно равен 1 мл.

¹¹Рекомендуется калибровку проводить в кюветах в 1 см, т. е. $l = 1$.

3. Отношение $V_{\text{гидролизат}}/V_{\text{аликвота}}$ по сути является коэффициентом разбавления щелочного гидролизата, т. е. это отношение показывает, во сколько раз количество белка во всём объёме гидролизата превышает количество белка в рабочем объёме.

Таким образом, числитель формулы (1) указывает на количество растворённого белка в мкг во всём объёме гидролизата. Знаменатель — навеска, выраженная в мкг.

Формулу (1) в компактном виде можно представить как:

$$C = \frac{\Delta D}{K} \cdot \frac{V_{\text{гидролизат}}}{10 \cdot m (1 - k) \cdot V_{\text{аликвота}}}, \% \quad (2)$$

Пример расчёта. Ниже приведены результаты шести параллельных измерений массовой доли белка в биомассе спироулины:

$$C = \frac{\Delta D}{K} \cdot \frac{V_{\text{гидролизат}}}{10 \cdot m (1 - k) \cdot V_{\text{аликвота}}} =$$

$$= \frac{D_{750} - 0,028}{0,00272} \cdot \frac{3}{10 \cdot m (1 - 0,07) \cdot 0,2}.$$

Среднее значение оптической плотности холостой пробы $D_0 = 0,028$.

№	Навеска, m, мг	D_{750}	$\Delta D_{750} = D_{750} - 0,028$	Белок, C, %
1	3,85	0,411	0,383	58,99
2	3,25	0,361	0,333	60,76
3	4,40	0,473	0,445	59,97
4	4,55	0,492	0,464	60,47
5	5,15	0,560	0,532	61,26
6	3,70	0,412	0,384	61,54

Среднее значение:

$$\bar{C} = \frac{\sum_1^6 C_i}{6} = 60,5\%.$$

Минимальное значение: 58,99 %.

Максимальное значение: 61,54 %.

Несмещённая средняя квадратичная ошибка:

$$S_6 = \sqrt{\frac{\sum_1^6 (\bar{C} - C_i)^2}{6 - 1}} = 0,93.$$

Коэффициент вариации:

$$V = \frac{S_6}{\bar{C}} \cdot 100 \% = \frac{0,93}{60,5} \cdot 100 \% = 1,53 \%.$$

Доверительный интервал для среднего:

$$P \left(\bar{C} - 2,57 \frac{S_6}{\sqrt{6}} < C < \bar{C} + 2,57 \frac{S_6}{\sqrt{6}} \right) = 0,95,$$

$$P(60,5 - 0,97 < C < 60,5 + 0,97) = 0,95.$$

Концентрация белка в спиролине равна $C = 60,5 \pm 0,97 \%$.

Второй пример расчёта. Результаты восьми параллельных измерений массовой доли белка в биомассе морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin:

$$C = \frac{\Delta D}{K} \cdot \frac{V_{\text{гидролизат}}}{10 \cdot m (1 - k) \cdot V_{\text{аликвота}}} =$$

$$= \frac{D_{750} - 0,028}{0,00369} \cdot \frac{3}{10 \cdot m (1 - 0,1) \cdot 0,4}.$$

Среднее значение оптической плотности холостой пробы $D_0 = 0,028$.

№	Навеска, m, мг	D_{750}	$\Delta D_{750} = D_{750} - 0,028$	Белок, C, %
1	5,1	0,7847	0,7567	33,52
2	5,1	0,7731	0,7451	33,00
3	4,9	0,8142	0,7862	36,24
4	4,9	0,8158	0,7878	36,32
5	4,4	0,6640	0,6360	32,65
6	4,4	0,6772	0,6492	33,33
7	3,8	0,6329	0,6049	35,96
8	3,8	0,6023	0,5743	34,14

Среднее значение:

$$\bar{C} = \frac{\sum_1^8 C_i}{8} = 34,4 \text{ \%}.$$

Минимальное значение: 32,65 %.

Максимальное значение: 36,32 %.

Несмещённая средняя квадратичная ошибка:

$$S_8 = \sqrt{\frac{\sum_1^8 (\bar{C} - C_i)^2}{8 - 1}} = 1,54.$$

Коэффициент вариации:

$$V = \frac{S_8}{\bar{C}} \cdot 100 \text{ \%} = \frac{1,54}{34,4} \cdot 100 \text{ \%} = 4,47 \text{ \%}.$$

Доверительный интервал для среднего:

$$P \left(\bar{C} - 2,36 \frac{S_8}{\sqrt{8}} < C < \bar{C} + 2,36 \frac{S_8}{\sqrt{8}} \right) = 0,95,$$

$$P(34,4 - 1,28 < C < 34,4 + 1,28) = 0,95.$$

Концентрация белка в спиролине равна $C = 34,4 \pm 1,28 \text{ \%}$.

Заключение

Несмотря на то что метод определения белка по Лоури был опубликован в середине прошлого столетия, в литературе до сих пор встречаются публикации, описывающие границы применимости этого метода для различных условий. Как было отмечено выше (см. таблицу 1), корректному определению белка по Лоури может препятствовать наличие целого ряда химических веществ. Поэтому особые трудности возникают при работе с плотной интенсивной культурой микроводорослей, когда используются высококонцентрированные питательные среды. Для биомассы, полученной в интенсивной культуре, особое внимание следует уделять этапу пробоподготовки — переводу белка в водный раствор. Например, экспериментально показано, что результаты измерений доли белка в спиролине могут дать различные результаты в зависимости от того, насколько тщательно промыта биомасса от культуральной среды.

Ввиду вышесказанного непосредственно перед определением белка в биомассе микроводорослей методом Лоури рекомендуется собрать как можно больше информации о пробах, как то:

- в каких условиях культивировали микроводоросли;
- использовались ли какие-либо химические вещества при промывке биомассы;
- при каких условиях получена воздушно-сухая масса микроводорослей и т. п.

Рекомендуется предварительно сделать оценку содержания белка в пробе каким-либо экспресс методом, например по содержанию хлорофилла *a* в биомассе микроводорослей (см. рисунок 4).

После проведения анализа по методу Лоури рекомендуется определить концентрацию белка другими методами [3], например методом Смита [15] с использованием бициньхониновой кислоты (BCA).

Рекомендации по избежанию ошибок

Как и в любом деле, при постановке методики определения белка лучший способ исключить ошибки — проделать все процедуры под руководством опытного биохимика. Для контроля полезным будет после отработки методики сделать измерение в пробе с известным содержанием белка. Ниже перечислены типичные ошибки при отработке методики и рекомендации по их избежанию:

1. **Использование хромовой смеси для мытья химической посуды.** При подготовке к работе для мытья посуды достаточно воспользоваться обычной пищевой содой. После посуда многократно ополаскивается дистиллированной водой и высушивается в сушильном шкафу. Хромовая смесь является очень сильным окислителем, поэтому даже при многократном промывании посуды водой на поверхности стекла остаются микроколичества хромовой смеси, которые могут окислять белок, что приводит к некорректному определению концентрации белка в пробе.
2. **Ошибка измерения на определённой длине волны.** При отработке методики существенным является выбор длины световой волны для измерения концентрации белка в пробе. На рисунок 1 (с. 5) представлены спектры восстановленного реагента Фолина-Чокальтеу комплексом меди с пептидными связями разной концентрации. На основе этих спектров можно судить о возможных ошибках при измерении концентрации белка по оптической плотности. Из рисунка ясно, что наименьшая ошибка возникает при измерении на длине волны 750 нм, поскольку

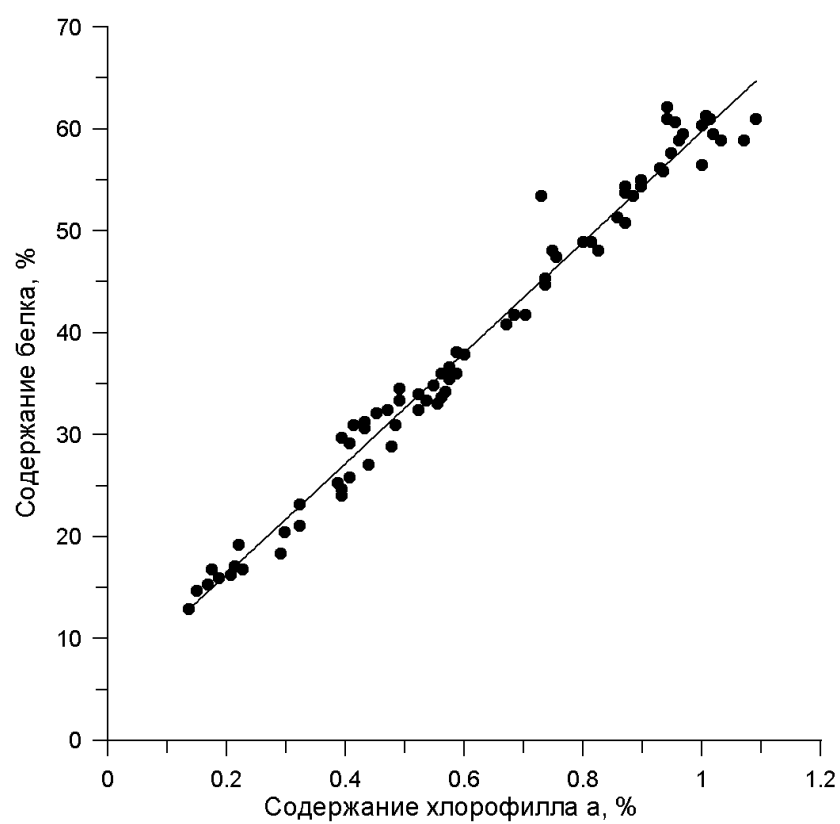


Рис. 4. Связь величины содержания белка и хлорофилла *a* в биомассе спирулины (данные из работы [5]). Белок = $54 \times \text{Хл} + 5,3$.

в этой точке производная функции $D'(\lambda) = 0$. В литературе встречаются рекомендации по использованию длин волн в диапазоне 500–660 нм [2, 8, 14], но с точки зрения минимизации ошибки измерений это не обосновано. Следует отметить, что при измерениях на длине волны 750 нм у метода повышается чувствительность, кроме того, отсутствует влияние эффекта «загрязнения» пробы фотосинтетическими пигментами [11]. На практике длины волн от 500 до 660 нм используют в тех случаях, когда необходимо «заглубить» измерения, поскольку по каким-либо причинам не удаётся получить линейность калибровочного графика для 750 нм.

3. **Неисправность дозатора.** Источником ошибок могут быть пипетки переменного объема для дозирования жидкости (дозаторы). Дело в том, что при износах поршня у дозатора появляется «плавающая ошибка», обнаружить которую не всегда представляется возможным. Работа такого дозатора становится нестабильной. Типичным признаком неисправности является либо отсутствие сходимости результатов измерений по всей шкале, либо «сползание» результата измерений уже после 5–10 дозирования фиксированного объёма. Обычно в такой ситуации дозатор разбирают и поршень смазывают прилагаемой силиконовой смазкой. Затем калибруют дозатор на аналитических весах по дистиллированной воде, полагая, что вес 1 мл воды равен 1 г. Примеры калибровочных кривых, полученных в результате работы с неисправным дозатором, приведены на рисунок 5 и 6.



«Плавающих» ошибок лишены стеклянные пипетки. Обычно они дают хорошую сходимость и не подвержены износу. Хотя стеклянные пипетки менее удобны, чем дозаторы, для исключения возможных ошибок рекомендуется использовать именно аналитические стеклянные пипетки с резиновой грушей или пипетатором (фингером). Для удобства резиновую грушу и стеклянную пипетку соединяют длинной силиконовой трубкой и удерживают одной рукой, как показано на рисунке слева.

Отметим также, что аналитические стеклянные пипетки калибруются, как правило, производителем и даже при длительном использовании дают надёжный результат¹².

¹²Напомним, что аналитические стеклянные пипетки не рекомендуется сушить в сушиль-

4. **Некорректные измерения оптической плотности.** Известно, что при измерении оптической плотности минимальная относительная ошибка лежит в области 0,4–0,5 ед. опт. пл.¹³ Поэтому рекомендуется подбирать аликвоту щелочного гидролизата (см. п. 3 на с. 13) таким образом, чтобы значение оптической плотности попадало именно в этот диапазон.

Обратим внимание на рисунок 7. Налицо отсутствие линейности калибровочного графика, которая, на первый взгляд, происходит в силу нарушения закона Бугера-Ламберта-Бера при больших концентрациях светопоглощающих частиц в растворе. Такое утверждение вполне разумно для значений более 0,8 ед. опт. пл., но не для диапазона 0,2–0,8. На самом деле ошибка кроется скорее не в оптических измерениях, а в систематической погрешности дозатора либо в некачественных растворах **А**, **В** или **Д**. Экспериментально показано, что линейность калибровочного графика соблюдается при использовании 750 нм до 300 мкг/мл, а при использовании длин волн от 500 нм и выше — до 2000 мкг/мл [8].

5. **Мутный реактив.** При приготовлении раствора **В** (см. с. 8) следует медный купорос и тартрат натрия растворять отдельно. И только после полного растворения объединять растворы. В противном случае раствор **В** может получиться мутным, что приведёт к значительному занижению угла наклона калибровочной кривой (см. рисунок 8). Обычно значение коэффициента 1/К близко к диапазону 300–400. Если реактив всё же получается мутным, рекомендуется перекристаллизовать медный купорос.
6. **Неполное осаждение пигментированной взвеси.** Систематическая ошибка может возникать при использовании в работе центрифуги ОПН-3, которая характеризуется максимальным центростремительным ускорением, равным 1600 g (3 000 об/мин). Когда в водном растворе после гидролиза белков (см. п. 2 на с. 13) присутствует мелкодисперсная взвесь пигментированных остатков разрушенной биомассы, раствор приобретает жёлто-зелёную окраску. Образующую взвесь невозможно осадить центрифугированием при 1600 g. Для осаждения необходимо не менее 5 000 g (7 000–8 000 об/мин).

7. **Неполная экстракция белка.** Заниженное значение белка может

ном шкафу при температуре более 40 °С.

¹³Для аналитических измерений концентрации вещества в растворе считается допустимым использование диапазона от 0,2 до 0,8 ед. опт. пл. [4].

быть связано с неполной экстракцией белка из биомассы при щелочном гидролизе. Причинами тому могут служить использование неоправданно большой навески микроводорослей либо недостаточное время экстракции белков из биомассы. Заниженное значение также может быть связано с недостаточной крепостью щёлочи. Например, экспериментально установлено, что для определения концентрации белка у спирулины навеска должна быть в пределах 3–6 мг, раствор щёлочи — не менее 0,1 н, а время экстракции белков — не менее 5 минут. Для определения белка у морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* 0,1 н щёлочи недостаточно, поэтому используют 1 н раствор NaOH, а время экстракции белков увеличивают до 10 минут.

8. **Угол наклона калибровочной кривой.** Для исключения ошибок, связанных с изменением угла наклона калибровочной кривой, необходимо новую калибровку проводить всякий раз, когда условия измерений меняются: при замене реактивов, приборов, при проведении анализа в другой лаборатории и пр. Новую калибровку следует строить даже при изменении крепости щёлочи (см. рисунок 3 на с. 14).
9. **Последовательность экстракции веществ из биомассы.** Важным моментом в экспериментальной работе с культурами микроводорослей является необходимость определения целого ряда биохимических составляющих биомассы. Для подобных целей разработаны комплексные методы биохимического анализа [1, 6, 7], которые основаны на поэтапном экстрагировании исследуемых веществ. Например, при необходимости определения и пигментного состава, и белка из пробы последовательно экстрагируются ацетоном или другим растворителем пигменты, затем в этой же пробе определяется белок. Однако для некоторых видов микроводорослей, для спирулины в частности, такой подход использовать не рекомендуется, поскольку экспериментально показано, что предварительное экстрагирование пигментов ацетоном приводит к завышению результатов измерений белка и отсутствию воспроизводимости. Аналогичный результат получен и для других видов водорослей [10].

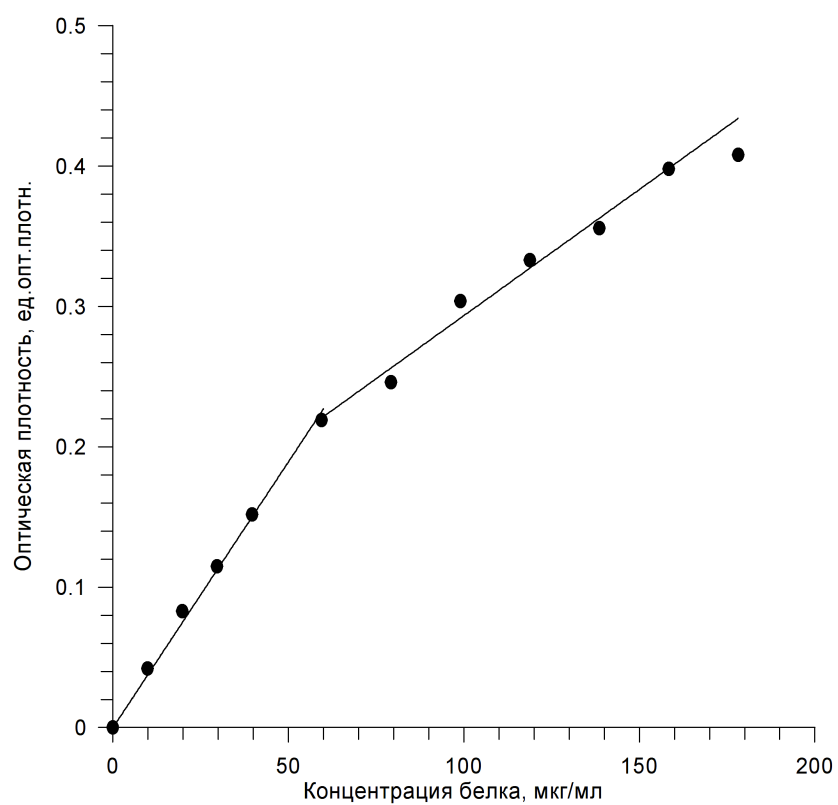


Рис. 5. Явный излом на калибровочном графике, обусловленный систематической погрешностью дозатора.

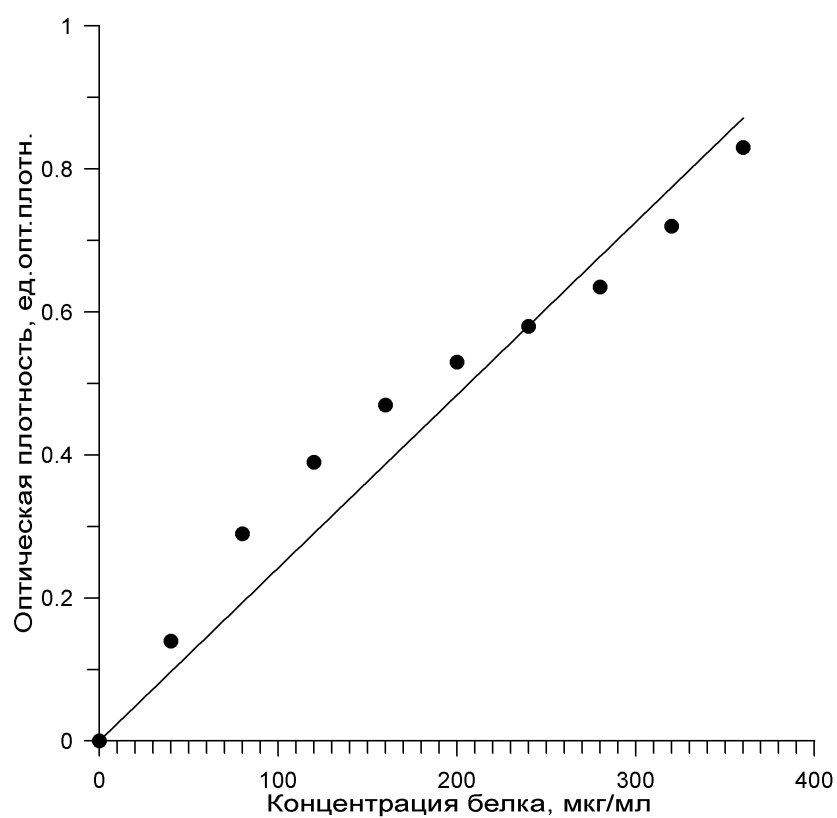


Рис. 6. Отсутствие линейности калибровочного графика вследствие «плавающей» ошибки дозатора.

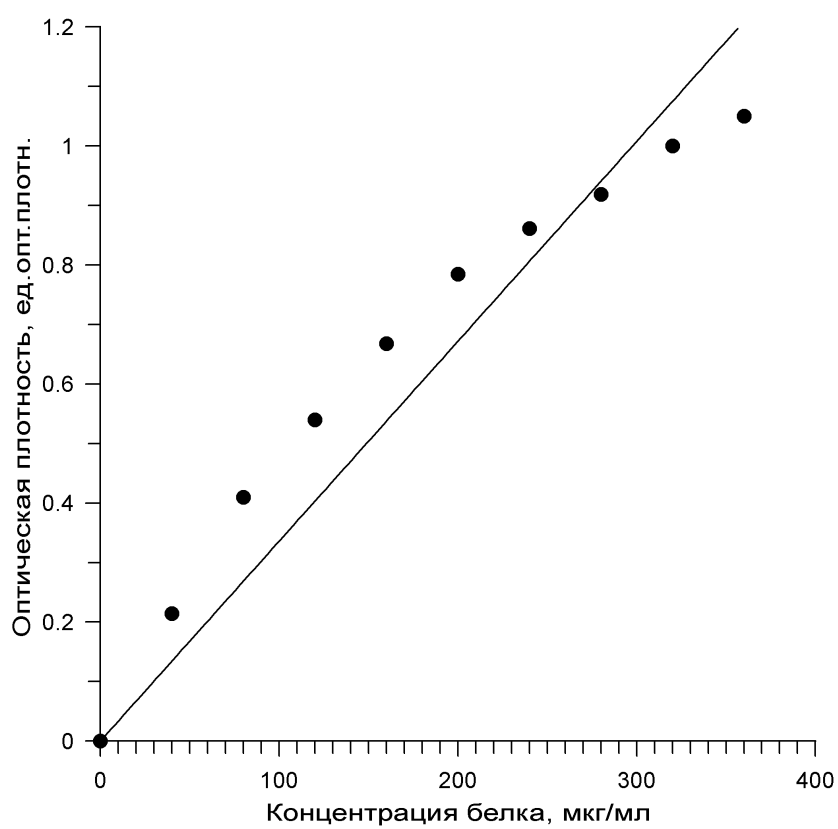


Рис. 7. Отсутствие линейности калибровочного графика вследствие «плавающей» ошибки дозатора.

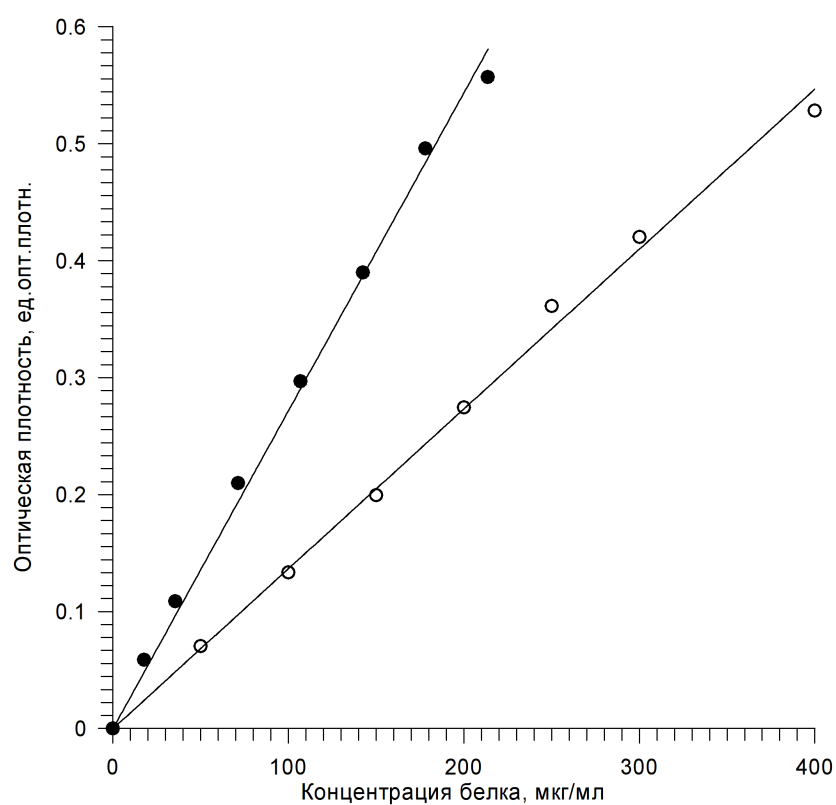


Рис. 8. Пример калибровочного графика (белые маркеры) с заниженным значением угла наклона $K = 0,00137$ ($1/K = 732$), который получен в результате работы с мутным раствором **В** (см. с. 8). Обычно значение коэффициента $1/K$ близко к 300–400. Для сравнения приведён калибровочный график со страницы 11 (чёрные маркеры). $1/K = 368$.

Приложение А

Порядок приготовления реактива Фолина-Чокальтеу

В ряде случаев имеет смысл рассмотреть возможность приобретения готового реактива Фолина-Чокальтеу в специализированных магазинах химических реактивов. Особенно это касается тех случаев, когда опыта работы с опасными веществами, такими как жидкий бром, недостаточно. До использования в работе приобретённого реактива необходимо определить его нормальную концентрацию (см. Приложение Б на с. 36).

Оборудование

1. Электроплита с закрытой спиралью.
2. Паяльная горелка с насадкой Теклю или Бунзена.
3. Медицинский безмасляный компрессор для паяльной горелки.
4. Нож для стекла или надфиль.
5. Защитные очки для работы со стеклом и жидким бромом.
6. Весы технические с абсолютной погрешностью ± 50 мг.

Посуда

1. Круглодонная колба со шлифом объёмом 2 л.
2. Обратный холодильник Аллина (шариковый).
3. Мерный цилиндр 1 000 мл с абсолютной погрешностью ± 5 мл.
4. Мерный цилиндр 100 мл с абсолютной погрешностью $\pm 0,5$ мл.
5. Воронка стеклянная.
6. Стеклянная палочка для пайки ампулы с бромом.
7. Стакан для взвешивания солей.

Реактивы

1. Вольфрамвокислый натрий, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, х. ч. или ч. д. а.
2. Молибдат натрия, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, х. ч. или ч. д. а.
3. 85,7%-ная ортофосфорная кислота, H_3PO_4 , х. ч. или ч. д. а.
4. Концентрированная соляная кислота, HCl , х. ч. или ч. д. а.
5. Сульфат лития, $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, х. ч. или ч. д. а.
6. Бром, Br_2 , х. ч. или ч. д. а.
7. Фенолфталеин, индикатор, ч., 1%-ный спиртовой раствор.
8. Вода дистиллированная.

Меры предосторожности при работе с бромом

Прежде чем приступать к работе, важно провести тщательную проверку всего необходимого. Особое внимание следует обратить на соблюдение мер безопасности в работе с жидким бромом как с опасным, ядовитым веществом. Бром летуч и сильно действует на слизистую оболочку. Все работы с бромом следует проводить в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу, в спецодежде, в резиновых перчатках и защитных очках.

По ходу работы потребуется вскрыть ампулу с жидким бромом и после использования нескольких капель брома запаять её с помощью паяльной горелки. При пайке ампулы с бромом может возникнуть непредвиденная ситуация, поэтому следует заранее подготовить запасную ампулу и стеклянную палочку на случай, если потребуется перелить бром. Ампула должна быть с немного оттянутым концом (для удобства пайки).

При попадании брома на слизистую необходимо срочно промыть глаза, полость рта и носа раствором двууглекислого натрия (питьевой содой). Попадание на кожу брома вызывает трудно заживающие раны, поэтому обожжённые места нужно тщательно промыть петролейным эфиром до исчезновения запаха брома, а затем втереть в кожу глицерин. Также после ожога бром можно смыть бензолом или 10%-ным раствором тиосульфата натрия. После промывания поражённых мест нужно, как и при тепловых ожогах, наложить повязку с противоожоговой мазью.

Ампулу с бромом хранить только в предназначенной для транспортировки таре.

Ход работы

1. Используемую в работе посуду моют хромовой смесью и водой, затем ополаскивают дистиллированной водой.
2. Взвешивают 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Навески солей помещают в круглодонную колбу и приливают 700 мл дистиллированной воды.
3. После полного растворения¹⁴ солей добавляют 50 мл 85,7%-ной фосфорной кислоты, раствор перемешивают.
4. Далее к раствору добавляют 100 мл концентрированной соляной кислоты и снова перемешивают¹⁵.
5. Раствор кипятят в течение 10 часов, используя обратный холодильник.
6. После кипячения убирают холодильник и добавляют в раствор 150 г сульфата лития¹⁶ и 50 мл дистиллированной воды.
7. После полного растворения сульфата лития добавляют несколько капель брома, для этого:
 - а) с помощью ножа делают надрез и обламывают кончик ампулы с бромом;
 - б) аккуратно добавляют несколько капель брома в раствор, перемешивают;
 - в) с помощью паяльной горелки и стеклянной палочки запаивают обломанный конец ампулы.
8. Кипятят смесь без холодильника в течение 15 минут для удаления избытка брома.
9. Фильтруют раствор через стеклянный фильтр и доводят до 1 л дистиллированной водой.

¹⁴Соли растворяются достаточно медленно, поэтому допускается растворение при небольшом нагревании.

¹⁵После добавления кислот в растворе появляются белые хлопья, поэтому раствор следует сразу же перемешать.

¹⁶При добавлении сульфата лития следует проявлять осторожность, поскольку добавление холодных кристаллов соли в горячий раствор может привести к вспениванию и выплёскиванию раствора из колбы. Сульфат лития следует добавлять небольшими порциями через воронку.

10. Реактив Фолина-Чокальтеу титруют 1 н раствором гидроокиси натрия и на основании полученных данных рассчитывают его кислотность (см. Приложение Б). Перед употреблением реактив Фолина-Чокальтеу разбавляют водой до кислотности, соответствующей таковой 1 н раствора соляной кислоты [9].

Замечание. Реактив должен быть золотисто-жёлтого цвета без зелёного оттенка. При наличии зелёного оттенка реакционной смеси необходимо провести очистку используемых реактивов. Чаще всего неудовлетворительные результаты объясняются наличием примеси катионов в соляной кислоте, которую рекомендуется предварительно очистить перегонкой и насытить далее хлороводородом до плотности 1,18.

Хранение реактива

Хранят в холодильнике в закрытой склянке тёмного стекла. При хранении и использовании реактива его предохраняют от попадания пыли, органических веществ и прямых солнечных лучей.

Замечание. До перенесения готового реактива Фолина-Чокальтеу в ёмкость для хранения её промывают небольшим количеством реактива.

Фотогалерея



Раствор солей $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ после добавления кислот должен оставаться прозрачным.



Ампула с бромом и подготовка запасной ампулы.



Растворение сульфата лития. Открытая ампула с бромом.



Раствор после добавления нескольких капель брома.
Готовый реактив Фолина-Чокальтеу.

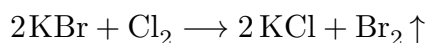
Задача для школьника

Определить процент содержания хлора в навеске $m = 6$ г бром-сырца¹⁷, если для анализа взяли 1,6 г KBr, а после проведения реакции и прокаливании до постоянной массы в остатке соли KBr + KCl образовалось 1,3 г.

Решить задачу двумя способами — с использованием и без использования понятия о количестве моль прореагировавшего вещества.

Решение 1

Уравнение реакции имеет вид:



Из уравнения видно, что если X моль KBr прореагировало, тогда X моль KCl образовалось, при этом в реакцию вступило $X/2$ моль Cl_2 . По условию, разница масс составляет $1,6 - 1,3 = 0,3$ г. Т. к. $M(\text{KBr}) > M(\text{KCl})$, запишем равенство:

$$X \cdot M(\text{KBr}) - X \cdot M(\text{KCl}) = 0,3$$

или

$$X \cdot 119 - X \cdot 74 = 0,3, \quad \text{откуда} \quad X = \frac{0,3}{45}.$$

Следовательно, примесь хлора в бром-сырце составляет:

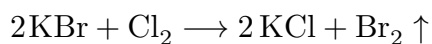
$$\frac{0,3}{2 \cdot 45} \cdot \frac{M(\text{Cl}_2)}{6} \cdot 100 \% = \frac{0,3}{2 \cdot 45} \cdot \frac{70,9}{6} \cdot 100 \% = 3,9 \%.$$

Ответ:

В бром-сырце содержится 3,9 % хлора.

Решение 2

Уравнение реакции имеет вид:



Молярная масса солей KBr и KCl равна: $M(\text{KBr}) = 39 + 80 = 119$ и $M(\text{KCl}) = 39 + 35 = 74$. Пусть X г KBr прореагировало с Cl_2 , содержащимся в бром-сырце, тогда масса KCl после реакции будет равна:

$$X \cdot k, \quad \text{где} \quad k = \frac{74}{119}.$$

¹⁷ Жидкий бром имеет, как правило, некоторый процент загрязнения хлором, т. е. речь идёт о смеси брома и хлора.

По условию, масса уменьшилась на $1,6 - 1,3 = 0,3$ г, поэтому справедливо следующее равенство:

$$X - X \cdot k = 0,3 \text{ г, откуда } X = \frac{0,3}{1 - \frac{74}{119}} = 0,79 \text{ г.}$$

0,79 г KBr прореагировало с Cl_2 , содержащимся в бром-сырце, при этом образовалось $0,79 \cdot \frac{74}{119} = 0,49$ г KCl.

Доля хлора в молекуле KCl составляет $\frac{35}{74}$, т.е. примесь хлора в бром-сырце составляет $0,49 \cdot \frac{35}{74} = 0,2$ г. Следовательно, процент содержания хлора в навеске $m = 6$ г бром-сырца равен:

$$\frac{0,2}{6} \cdot 100 \% = 3,9 \%$$

Ответ:

В бром-сырце содержится 3,9 % хлора.

Приложение Б

Титрование реактива Фолина-Чокальтеу

Для определения белка используют разбавленный дистиллированной водой реактив Фолина-Чокальтеу до кислотности, соответствующей 1 н раствору соляной кислоты [9]. Чтобы рассчитать коэффициент разбавления, необходимо установить нормальную концентрацию свежеприготовленного реактива Фолина-Чокальтеу. Для этой цели реактив Фолина-Чокальтеу титруют раствором щёлочи.

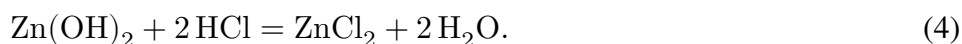
Терминология

Нормальная (эквивалентная) концентрация раствора — количество эквивалентов (грамм-эквивалентов) растворённого вещества в 1 литре раствора. Для сокращения записи используют «н» или «N».

Эквивалент вещества — это реальная или условная частица, которая эквивалентна катиону водорода в кислотно-основных (ионообменных) химических реакциях или электрону в окислительно-восстановительных реакциях. Другими словами, эквивалент вещества — это число моль вещества, эквивалентное одному молю катионов водорода в рассматриваемой реакции. Например:



В данной реакции эквивалентом является реальная частица — ион Na^+ .



В данной реакции эквивалентом является мнимая частица $\frac{1}{2}\text{Zn}^+$.

Грамм-эквивалент вещества — количество граммов вещества, численно равное его эквиваленту.

Например, 1 н раствор гидроксида натрия означает, что в 1 л воды находится 1 моль частиц Na^+ , эквивалентных 1 молю H^+ в соответствии с уравнением (3). Т. е. для приготовления 1 н раствора необходимо $M(\text{NaOH}) = 40$ г растворить в 1 л воды.

Для приготовления 1 н раствора гидроксида цинка, в соответствии с уравнением (4), потребуется $M(\text{Zn}(\text{OH})_2) / 2 = 99,4/2 = 49,7$ г соли.

Теоретическое введение

Титрование — метод количественного анализа, основанный на измерении количества реагента, необходимого для взаимодействия с компонентом в рас-

творе в соответствии со стехиометрией химической реакции между ними.

Титрование позволяет по объёму титранта в конце титрования рассчитать концентрацию анализируемого раствора по формуле:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2,$$

где C_1 — нормальная концентрация анализируемого раствора, моль/л; C_2 — нормальная концентрация титранта, моль/л; V_1 — объём анализируемого раствора, л; V_2 — объём титранта, л.

Нормальную концентрацию раствора вычисляют по формуле:

$$C_1 = \frac{V_2 \cdot C_2}{V_1}, \text{ моль/л.} \quad (5)$$

Теоретически необходимо добавить такой объём титранта, который несёт в себе количество реагента, эквивалентное количеству определяемого компонента в соответствии со стехиометрией реакции между ними при условии, что это реакция практически необратима. Этот объём титранта называется *точкой эквивалентности*. На практике определяют *конечную точку титрования*, которая должна быть максимально близка к точке эквивалентности.

Конечную точку титрования при добавлении малыми порциями титранта фиксируют по достаточно резкому изменению какой-либо физической характеристики раствора, зависящей от концентрации определяемого вещества. Например, по изменению окраски раствора, либо оптической плотности, либо величины рН и т. п.

При титровании реактива Фолина-Чокальтеу раствором щёлочи *конечную точку титрования* определяют по величине рН. Титрование прекращают после полной нейтрализации кислоты щёлочью, т. е. по достижении рН = 7.

Для повышения точности титрования реактив Фолина-Чокальтеу и раствор щёлочи разбавляют дистиллированной водой. Коэффициент разбавления подбирают экспериментально из соображений минимизации расхода реактивов и затрат времени на титрование¹⁸.

Оборудование

1. Ионномер лабораторный для измерения рН, с абсолютной погрешностью $\pm 0,020$.
2. Мешалка магнитная лабораторная.

¹⁸Также следует отметить, что при разбавлении точность титрования повышается, поскольку добавление разбавленной щёлочи приводит к малым изменениям величины рН.

Посуда

1. Мерная колба объёмом 100 мл, абсолютная погрешность $\pm 0,2$ мл.
2. Стакан химический объёмом 150 мл.
3. Мерный цилиндр объёмом 100 мл с абсолютной погрешностью $\pm 0,5$ мл.
4. Аналитическая стеклянная пипетка объёмом 10 мл на полный слив (KLIN) с абсолютной погрешностью $\pm 0,1$ мл.

Реактивы

1. Гидроксид натрия NaOH (или калия KOH), х. ч. или ч. д. а.
2. Вода дистиллированная.
3. Свежеприготовленный реактив Фолина-Чокальтеу (см. Приложение А).

Подготовка реактивов

1. *0,1 н раствор щёлочи.* 0,4 г гидроксида натрия (или 0,56 г гидроксида калия) растворить¹⁹ в 100 мл дистиллированной воды.
2. *Реактив Фолина-Чокальтеу* разбавить в 40 раз дистиллированной водой. Для этого аликвоту 2,5 мл концентрированного реактива Фолина-Чокальтеу поместить в мерную колбу и довести объём до 100 мл дистиллированной водой.

Ход работы

1. 50 мл разбавленного реактива Фолина-Чокальтеу вносят в химический стакан объёмом 150 мл.
2. В стакан с разбавленным реактивом Фолина-Чокальтеу устанавливают электрод pH-метра.
3. *Титрование.* При постоянном перемешивании по каплям добавляют 0,1 н раствор щёлочи с помощью мерной пипетки объёмом 10 мл, контролируя величину pH. Конечную точку титрования устанавливают по достижении нейтральной величины pH = 7.

¹⁹Гидроксид натрия гигроскопичен, поэтому навеску делают в стеклянном стакане с минимальной затратой времени, чтобы погрешность, связанная с поглощением влаги из атмосферы, была минимальной.

4. По шкале мерной пипетки определяют объём раствора щёлочи, ушедший на титрование.
5. Вычисляют нормальную концентрацию реактива Фолина-Чокальтеу по формуле (5).

Пример вычисления результатов

Исходные данные. 50 мл разбавленного в 40 раз реактива Фолина-Чокальтеу титровали 0,1 н раствором щёлочи, при этом для достижения конечной точки титрования потребовалось 24,2 мл щёлочи.

Расчёт нормальной концентрации. Используя исходные данные и формулу (5), находим нормальную концентрацию разбавленного реактива Фолина-Чокальтеу:

$$C_1 = \frac{0,1 \cdot 24,2}{50} = 0,0484 \text{ моль/л.}$$

Следовательно, нормальная концентрация реактива Фолина-Чокальтеу до разбавления равна $0,0484 \times 40 = 1,94 \approx 2$ моль-экв/л. Таким образом, чтобы получить реактив Фолина-Чокальтеу, соответствующий 1 н раствору соляной кислоты, необходимо исходный реактив Фолина-Чокальтеу разбавить дистиллированной водой в 2 раза.



Приложение В

Рекомендуемое оборудование

1. Весы аналитические ВЛР-200, 0–200 г, класс 2. Допустимая погрешность измерения массы по шкале мг — не более $\pm 0,15$ мг. Набор гирь Г 2–210, 0–200 г, 2-й класс.
2. Весы электронные Sartorius, предельная нагрузка 200 г, погрешность $\pm 0,001$ г.
3. Весы технические ВЛК-500-М с абсолютной погрешностью ± 50 мг.
4. Центрифуга лабораторная ОПН-8. Частота обращения ротора 1000–8000 об/мин. Допускаемое приведённое отклонение заданной частоты вращения — не более ± 10 %. Фактор разделения для скорости в 8000 об/мин $\Phi_{8000} = 6600$ g.
5. Автоматически регистрирующий спектрофотометр СФ-2000 (ЛОМО, Россия). Спектральный диапазон 200–1100 нм. Диапазон измерений спектральных коэффициентов направленного пропускания 1–100 % с абсолютной погрешностью не более 1 %. Предел допускаемого значения среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности спектрофотометра при измерении спектральных коэффициентов направленного пропускания 0,2 %. Набор кварцевых кювет в 1 см, входящий в комплект поставки прибора.
6. Аналитические стеклянные пипетки объёмом 10–100 мкл, 200–1000 мкл и 1000–5000 мкл с резиновой грушей или пипетатором (фингером) поршневым, либо дозаторы «Biohit»: 1000–5000 мкл, ± 1 %; 10–100 мкл, $\pm 2,5$ %; 200–1000 мкл, $\pm 1,5$ % (см. п. 3 на с. 21).
7. Агатовая или нефритовая ступка с пестиком.
8. Водяная баня типа LW-1 (Labimex) или водяная баня любого другого типа, снабжённая терморегулирующим устройством, обеспечивающим поддержание температуры 100 °С.
9. Иономер лабораторный И-160М с ионоселективным стеклянным электродом ЭСК-43-07 для измерения рН, группа В4 ГОСТ 12997-84, с абсолютной погрешностью $\pm 0,020$.

Список литературы

1. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидро-биологической практике. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
2. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры / под. ред. А. И. Агатовой. — М. : Изд-во ВНИРО, 2004. — 123 с.
3. Невмержицкая Ю. Ю., Тимофеева О. А. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): учеб.-метод. пособие. — Казань : Казанский университет, 2012. — 36 с.
4. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фото-биологических процессов: учеб. пособие для мед. и биол. спец. вузов. — М. : Высш. шк., 1989. — 199 с.
5. Дробецкая И. В. Влияние условий минерального питания на рост и химический состав *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler: Дис... канд. биол. наук : 03.00.17 / Ин-т биологии южных морей им. А. О. Ковалевского. — Севастополь, 2005. — 167 с.
6. Копытов Ю. П., Дивавин И. А., Цымбал И. М. Схема комплексного биохимического анализа гидробионтов // Рациональное использование ресурсов моря — важный вклад в реализацию продовольственной программы: мат. конф. (Севастополь, 10–11 дек. 1984 г.). — Севастополь, 1984. — Ч. 2. — С. 227–231.
7. Копытов Ю. П., Лелеков А. С., Геворгиз Р. Г., Нехорошев М. В., Новикова Т. М. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей // Альгология. — 2015. — Т. 25, № 1. — С. 35–40.
8. Степанченко Н. С., Новикова Г. В., Мошков И. Е. Количественное определение содержания белка // Физиол. раст. — 2011. — Т. 58, № 4. — С. 624–630.
9. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. — М. : Просвещение, 1975. — с. 304.
10. Berges J. A., Fisher A. F., Harrison P. J. A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* // Mar. Biol. — 1993. — Vol. 115. — P. 187–193.

11. Eze J. M., Dumbroff E. B. A comparison of the Bradford and Lowry methods for the analysis of the protein in chlorophyllous tissue // *Can. J. Bot.* — 1982. — Vol. 60. — P. 1046–1049.
12. Folin O., Ciocalteu V. On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins // *J. Biol. Chem.* — 1927. — Vol. 73, no. 2. — P. 627–650.
13. Gornall A. G., Bardawill C. J. David M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // *J. Biol. Chem.* — 1949. — Vol. 177. — P. 751–766.
14. Lowry O., Rosebrough N. J., Faar A. L. et al. Protein measurement with folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — P. 265–275.
15. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Frovenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid // *Anal. Biochem.* — 1985, — V. 19. — P. 76–85.

Геворгиз Руслан Георгиевич
e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Железнова Светлана Николаевна
e-mail: zheleznovasveta@yandex.ru

Нехорошев Михаил Валентинович
e-mail: mnekhoroshev@gmail.com

R. G. Gevorgiz, S.N. Zheleznova, M. V. Nekhoroshev

Quantitative determination of the mass fraction of total proteins in dry biomass of microalgae by the Lowry method : educational and methodological manual / RAS, Kovalevsky Institute of Marine Biological Research. — Sevastopol, 2017. — 43 p. — (Working paper / RAS, IMBR).

This training aid provides detailed instructions on the quantitative determination of the mass fraction of total proteins in the biomass of microalgae using Lowry's method. Attention is paid to possible errors in the storage of samples, in the sample preparation and measurements. Optimal conditions for protein extraction and measurements are specified, and limitations of the applicability of Lowry's method are also highlighted. The final part of the training aid contains instructions for the preparation of the Folin-Chokalteu reagent and the measurement of its normal concentration.

The training aid is addressed to students and postgraduates of all specialties.