

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

ОСНОВИ ІНЖЕНЕРНОЇ ЕНЗИМОЛОГІЇ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до виконання лабораторних робіт

з навчальної дисципліни «Загальна біотехнологія»
для здобувачів вищої освіти спеціальності
162 «Біотехнології та біоінженерія»

Затверджено
Редакційно-видавничою
радою університету,
протокол № 3 від 24.10.2024 р.

Харків
НТУ «ХПІ»
2024

Основи інженерної ензимології : методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Загальна біотехнологія» для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Укладач О. О. Варанкіна. – Харків : НТУ "ХПІ", 2024. – 24 с.

Укладач О. О. Варанкіна

Рецензент С. М. Биканов

Кафедра біотехнології, біофізики та аналітичної хімії

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1. Основні положення.....	5
2. Техніка безпечної роботи в лабораторії.....	5
3. Дослідження активності ферментних препаратів.....	8
4. Дослідження адсорбційних способів іммобілізації ферментних препаратів.....	15
Список джерел інформації.....	20
Додаток 1. Приклад оформлення титульної сторінки.....	21

ВСТУП

Методичні вказівки призначені для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Загальна біотехнологія» здобувачами освіти спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» і можуть бути використані у практичній діяльності при дослідженні, розробці, використанні біокаталізаторів в біотехнологічних виробництвах.

У методичних вказівках наведено основні положення, техніку безпечної роботи в лабораторії, роботи щодо дослідження активності та адсорбційних методів іммобілізації ферментних препаратів, список джерел інформації та додаток.

Лабораторні роботи включають мету, план заняття, інформаційний матеріал, прилади й устаткування, реактиви та матеріали для проведення роботи, хід роботи, контрольні питання. У ході роботи містяться відомості щодо підготовки для випробування, проведення випробування та обробки результатів. Виконання лабораторних робіт розраховано на 12 аудиторних годин.

1. ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ

Курс «Загальна біотехнологія» вивчають протягом 6 семестру. Навчальним планом підготовки бакалаврів за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» з курсу «Загальна біотехнологія» передбачено проведення лабораторних робіт.

Мета лабораторних робіт – опанувати методику визначення активності ферментних препаратів амілолітичної дії, навчитися визначати адсорбційну ємність носіїв для іммобілізації ферментів, проводити іммобілізацію ферментів статичним і динамічним способами, оцінювати якість отриманих біокатализаторів.

Роботу щодо дослідження активності ферментних препаратів виконують на занятті при контролі оцукрюючих матеріалів для виробництва спирту етилового з харчової сировини та при вивченні активності іммобілізованих ферментів.

Лабораторні роботи виконують самостійно або у підгрупах. Викладач варіює завдання для кожного студента чи підгрупи в частині використання різних ферментних препаратів, носіїв для іммобілізації, ступеню подрібнення носія, часу іммобілізації тощо. Лабораторні роботи мають бути виконані і захищені в кінці відповідного заняття. За виконання та захист лабораторних робіт кожен студент отримує бали відповідно до розподілу балів, що вказаний в робочій програмі навчальної дисципліни чи в силабусі. Бали, що отримують студенти за виконання лабораторних робіт, будуть враховані при підсумковому оцінюванні навчальної дисципліни.

2. ТЕХНІКА БЕЗПЕЧНОЇ РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ

Допуск студентів до лабораторії дозволяють тільки після ознайомлення з інструкцією з техніки безпеки, вступного інструктажу та здачі заліку викладачеві, який веде лабораторне заняття у групі. Факт здачі заліку фіксують у спеціальному журналі під особистий підпис. Студенти, які грубо порушили правила роботи та техніки безпеки в лабораторії, усуваються викладачем, інженером, що обслуговує заняття, або перевіряючим від виконання лабораторних робіт до повторного складання заліку.

Відповідальність за зберігання реактивів, приладів, обладнання та матеріалів, правила їхньої видачі покладають на інженера лабораторії.

Кожен студент повинен знати, де у лабораторії знаходяться аптечка для надання першої медичної допомоги, індивідуальні засоби захисту (маска, рукавички, протигаз, гумове взуття, фартух, засоби пожежогасіння (ящик з піском, вогнестійка ковдра, вогнегасник), засоби для надання першої медичної допомоги (аптечка, 1 %-ві розчини: гідрокарбонату натрію, оцтової кислоти).

Наприкінці занять усі студенти зобов'язані навести лад на своєму робочому місці: прибрати сміття, вимити скляний посуд, уважно оглянути та перевірити вимкнення електроенергії, води, приладів та апаратів, здати посуд, реактиви та інші матеріали інженеру.

Найбільш ймовірними джерелами нещасних випадків є: невміле поводження з хімічними речовинами (отруєння, хімічні опіки, пожежі, вибухи, алергії), з лабораторними приладами (ураження електричним струмом, термічні опіки та травми), а також зі скляними приладами та посудом (порізи тощо). Знання та дотримання правил безпечної роботи дозволяють повністю виключити можливість нещасних випадків у лабораторії.

Загальні правила безпечної роботи в лабораторії наведені нижче. Студентам категорично забороняється без дозволу викладача проводити будь-які досліди, що не належать до конкретної роботи, або змінювати порядок проведення досліду. На заняттях постійно будьте вдягнені лабораторний халат. Уникайте безпосередніх контактів шкіри, очей та дихальних шляхів із хімічними реактивами. Довге волосся слід акуратно прибрати. Всі роботи з отруйними та сильно пахучими речовинами, з концентрованими розчинами кислот, лугів, а також упарювання їх розчинів слід проводити тільки у витяжній шафі. Стулки шафи під час роботи повинні бути опущені до 18...20 см від робочої поверхні. Подрібнення твердих речовин, що дають їдкий пил, розведення концентрованих кислот і лугів, приготування хромової суміші потрібно проводити у фарфоровому посуді у витяжній шафі, захистивши очі окулярами, а руки рукавичками. При розведенні концентрованих кислот обережно вливають кислоту у воду. З легкозаймистими рідинами не можна працювати поблизу нагрівальних приладів. Забороняється нагрівати леткі легкозаймисті рідини, речовини (ефіри, бензини, спирти та інші) на відкритому полум'ї. Для цього необхідно використовувати водяну або олійну баню. Перед використанням спиртівок їх заповнюють етанолом не більше 2/3 об'єму. Спиртівку запалюють тільки від сірника. Ніколи не слід дуги на палаючу спиртівку. Гасять її, накривши ковпачком. На спиртівці можна нагрівати лише посуд, що заповнений реакційною масою, із тонкого хімічного скла. Знайомлячись із запахом речовини потрібно направити рукою струмінь повітря

від отвору до себе і зробити носом легкий вдих. Забороняється набирати ротом за допомогою піпетки чи трубки будь-які речовини. Особливо уважно потрібно проводити складання установок зі скла. При цьому не можна затискати скляні вироби до лапок штативів без відповідної м'якої прокладки. Не можна нагрівати закупорені апарати та посуд, крім тих, що спеціально для цього призначені. Не можна нагрівати рідини в мірному посуді. Не можна нахилитися над отвором посудини, щоб уникнути попадання бризок на обличчя та одяг. Ніколи не спрямовуйте відкритий кінець посудини до себе чи у бік вашого сусіда. У лабораторії забороняється куштувати на смак реактиви, а також приймати їжу, пити та палити. Весь посуд з реактивами повинен бути підписаний. Не можна класти на лабораторні столи сторонні предмети (сумки, шапки та ін.), а також вішати у лабораторії верхній одяг. Про будь-яку подію в лабораторії, навіть найменшу, необхідно повідомити викладачеві або інженеру.

Основні правила протипожежної безпеки та поводження з електроприладами наведені нижче. Обережно поведіться з нагрівальними приладами. Забороняється працювати з несправним обладнанням та приладами. Категорично забороняється використовувати для підключення електроприлади з оголеними проводами або пошкодженою ізоляцією. Під час проведення дослідів, у яких може статися самозаймання, необхідно мати під руками азбестову ковдру, пісок та інші засоби пожежогасіння. У разі займання горючих речовин швидко увімкніть вентиляцію витяжної шафи, погасіть спиртівку, знеструмте електронагрівальні прилади, приберіть посудини з вогненебезпечними речовинами. Пожежу гасять наступним чином: рідини, що горять, прикрийте азбестом, а потім, якщо потрібно, засипте піском, але не заливайте водою; у разі займання одягу на людині необхідно накрити його азбестовою ковдрою; невеликі локальні пожежі гасити за допомогою вуглекислотного вогнегасника; при великому задимленні використовувати протигаз. У всіх випадках пожежі у лабораторії негайно викличте пожежну команду за телефоном «101», і, не чекаючи прибуття пожежників, прийміть всі заходи щодо ліквідації пожежі власними силами та наявними засобами. Студенти мають залишити лабораторію.

Основні заходи першої допомоги при нещасних випадках наведені нижче. Для надання першої допомоги у лабораторії є аптечка. У серйозних випадках необхідно постраждалого супроводити до лікаря. При дрібних порізах склом видаліть уламки з рани, продезінфікуйте розчином перекису водню та перев'яжіть бинтом. При опіку шкіри реактивом змийте реактив великою кількістю води, потім у разі опіку лугом – 1 % розчином оцтової кислоти, у разі

опіку кислотою – 1 % розчином гідрокарбонату натрію, а потім знову водою. Одяг, на який потрапила реактиви, слід зняти. При опіку гарячою рідиною або гарячим предметом промийте обпечене місце проточною холодною водою протягом 5–10 хвилин, викличте швидку допомогу. При попаданні хімічної речовини у очі промийте їх протягом 10-15 хвилин струменем холодної води, постраждалого необхідно доставити до лікаря. При попаданні отрути всередину необхідно негайно викликати швидку допомогу; викликати блювоту прийняттям теплої розчину кухонної солі (3-4 чайні ложки на склянку води) та потім натиснути пальцем на задню частину зіва. Якщо потерпілий знепритомнів або отруєння викликане ковтанням розчинника, кислоти або луги, то блювоту викликати не можна. Постраждалого перенести на свіже повітря і залишити у спокійному положенні у теплі. При ураженні електричним струмом необхідно негайно викликати швидку допомогу, швидко звільнити потерпілого від дії струму шляхом вимкнення електроенергії загальним рубильником. Винести потерпілого на свіже повітря і при необхідності зробити йому штучне дихання та масаж серця.

3. ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ

Мета роботи: опанувати методику визначення активності ферментних препаратів амілолітичної дії.

План заняття

1. Ознайомитися з теоретичною частиною та зробити стислий конспект.
2. Виконати практичну частину роботи щодо визначення амілолітичної активності ферментних препаратів.
3. Провести обробку результатів дослідження.
4. Зробити висновок за отриманими результатами.

Поняття амілолітичної активності

Амілолітична активність (АА) характеризує здатність амілолітичних ферментів каталізувати гідроліз крохмалю до декстринів з різною молекулярною масою і виражається числом одиниць амілази в 1 г препарату.

За одиницю амілолітичної активності прийнята така кількість ферменту, яка каталізує гідроліз на 30...50 % за 10 хвилин 1 г розчинного крохмалю при температурі 30 °С та рН 4,7.

Прилади й устаткування, реактиви та матеріали

- Фотоелектроколориметр зі світлофільтрами з довжиною хвилі в інтервалі 434-450 та 656-670 нм зі скляними кюветами з товщиною світло поглинаючого шару 10 мм.
- рН-метр лабораторний або іономер універсальний.
- Ваги лабораторні загального призначення з найбільшою межею зважування 200 г, з ціною поділки 0,1 мг.
- Термометр ртутний скляний лабораторний з інтервалом виміру 0–55 °С, ціною поділки 0,1 °С.
- Склянка лабораторна місткістю 25 см³.
- Колби мірні 2-го класу точності, місткістю 100, 200 см³, 1 дм³.
- Піпетки місткістю 1, 2, 5, 10 см³.
- Пробірки діаметром 14-16 мм.
- Ферментний препарат амілолітичної дії бактеріального походження.
- Крохмаль розчинний, розчин з концентрацією 10 г/дм³.
- Натрій фосфорнокислий двозаміщений (Na₂HPO₄), розчин з концентрацією 1/15 моль/дм³.
- Калій фосфорнокислий однозаміщений (KH₂PO₄), розчин з концентрацією 1/15 моль/дм³.
- Кислота соляна, розчин з концентрацією 0,1 моль/дм³.
- Йод кристалічний.
- Калій йодистий (KI).
- Папір фільтрувальний лабораторний.
- Баня водяна або ультратермостат.

Хід роботи

3.1. Підготовка до випробування

3.1.1. Приготування основного розчину ферментного препарату

З середньої проби у склянку беруть наважку досліджуваного ферментного препарату, що дорівнює 0,1 г. Наважку ретельно розтирають скляною паличкою з невеликою кількістю дистильованої води, кількісно переносять в мірну колбу місткістю 100 см³, доводять дистильованою водою до мітки та перемішують. Розчин ферментного препарату може зберігатися протягом однієї доби при температурі від +2°С до –4°С.

3.1.2 Приготування робочого розчину ферментного препарату

Робочий розчин готують шляхом розбавлення основного розчину так, щоб в 5 см³ робочого розчину містилась така кількість ферменту, під дією якого відбувається гідроліз крохмалю в межах від 20 % до 60 %.

Для цього беруть різну кількість ферментного розчину в залежності від передбачуваної амілолітичної активності досліджуваного препарату і розбавляють його дистильованою водою до 50 см³ чи 200 см³ в мірній колбі.

Для приготування робочого розчину потрібної концентрації кількість основного розчину (концентрацією 10 мг на 100 см³) знаходять за табл. 3.1 (стовпчик 3).

Таблиця 3.1 – Визначення кількості основного розчину ферментного препарату

Кількість одиниць АА в 1 г препарату	Кількість препарату, яка повинна міститися в 5 см ³ розбавленого розчину, мг	Кількість основного розчину, яка необхідна для другого розбавлення, см ³	Загальний об'єм розбавленого розчину, см ³
25-80	5,0	50,0	50,0
81-150	2,0	20,0	50,0
151-300	1,0	10,0	50,0
301-700	0,5	5,0	50,0
701-1200	0,25	10,0	200,0
1201-2500	0,125	5,0	200,0
2501-5000	0,05	2,0	200,0
5001 і вище	0,025	1,0	200,0

3.1.3. Приготування розчину крохмалю

1 г крохмалю в перерахунку на абсолютно суху речовину поміщають у мірну колбу місткістю 100 см³, додають 25 см³ дистильованої води і перемішують. Потім додають у колбу ще 25 см³ дистильованої води, поміщають колбу в киплячу водяну баню на 15-20 хв. безперервно перемішуючи вміст до повного розчинення крохмалю. Після цього вміст колби охолоджують, додають 10 см³ буферного фосфатного буферного розчину з рН 6.0 (для препаратів бактеріального походження). Об'єм рідини доводять до

мітки дистильованою водою при температурі 20 °С і вміст колби перемішують. Для одержаного розчину крохмалю характерна легка опалесценція.

Розчин крохмалю готують у день проведення аналізу та зберігають у закритому скляному посуді не більше 6 год.

3.1.4. Приготування фосфатного буферного розчину з рН 6,0

11,876 г фосфорнокислого двозаміщеного натрію розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм до 1 дм³ у мірній колбі.

9,078 г фосфорнокислого однозаміщеного калію розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм до 1 дм³, в мірній колбі.

Розчини змішують у співвідношенні 1:9 безпосередньо перед визначенням.

3.1.5. Приготування основного розчину йоду

0,5 г кристалічного йоду та 5 г йодистого калію розчиняють у малій кількості води та доводять об'єм до 200 см³ у мірній колбі. Зберігають в темному місці необмежений час.

3.1.6. Приготування робочого розчину йоду

Робочий розчин йоду готують із основного розчину. Для цього беруть 2 см³, основного розчину, розводять дистильованою водою до 100 см³ в мірній колбі. Перед використанням робочого розчину необхідно перевірити його оптичну густину на фотоелектроколориметрі зі світлофільтром з довжиною хвилі в межах 434-450 нм.

Оптична густина розчину йоду має дорівнювати 0,220. У разі відхилення оптичної густини розчину від цієї величини, її доводять до необхідної шляхом додавання кількох крапель води або основного розчину йоду.

3.2. Проведення випробування

В 2 пробірки (діаметр – 2 см, висота – 18 см) наливають по 10 см³ субстрату (розчину крохмалю) і ставлять їх в ультратермостат або водяну баню з постійною температурою 30,0±0,2 °С. У термостаті пробірки витримують протягом 5–10 хвилин, щоб розчини прийняли температуру термостата. Потім, не виймаючи пробірок з термостату, наливають в першу 5 см³ дистильованої води (контрольна проба) і в другу 5 см³ розведеного ферментного розчину (випробувальна проба). Суміш швидко перемішують і витримують в ультратермостаті протягом 10 хвилин.

Після закінчення цього часу пробірки з реакційною рідиною виймають з термостата, відбирають від контрольного і випробувального розчинів 1 см³ і переносять цю кількість в одну з пробірок з 10 см³ розчину соляної кислоти, що

були попередньо налиті туди. Соляна кислота перериває дію ферменту. Рідину збовтують, від кожної пробірки відбирають по 1 см³ і переносять у пробірки, в які попередньо наливають 10 см³ розчину йоду. Вміст пробірок перемішують.

Розчини набувають забарвлення: перший із контрольної проби – синій колір, другий із дослідного розчину – фіолетове забарвлення різної інтенсивності або інше забарвлення, залежно від кількості крохмалю, що не піддався гідролізу.

Після перемішування розчинів визначають їх оптичну густина на фотоелектроколориметрі із застосуванням кювет з шаром 1 см, світлофільтром з довжиною хвилі в інтервалі 656-670 нм.

Колориметрування проводять за інструкцією, що додається до кожного приладу. Оптична густина контрольного розчину пропорційна кількості вихідного крохмалю (субстрату). Оптична густина досліджувального розчину пропорційна кількості крохмалю, що залишився після дії ферменту. Різниця між показниками оптичних густин розчинів відповідає тій кількості крохмалю (субстрату), яка прогідролізована ферментним препаратом.

3.3. Обробка результатів

3.3.1. Визначення кількості крохмалю, що піддався гідролізу

Кількість крохмалю, що піддався гідролізу, (С) в г обчислюють за формулою:

$$C = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0,1$$

де D_1 – оптична густина контрольного розчину;

D_2 – оптична густина дослідного розчину;

0,1 – кількість крохмалю, що взяли на аналіз в якості субстрату, г.

Якщо виявиться, що кількість крохмалю, що піддався гідролізу, менше за 0,02 г або більше за 0,06 г, аналіз повторюють. Готують робочий розчин, беручи більшу або меншу кількість вихідного розчину для розведення.

У тому випадку, коли в результаті ферментативної реакції кількість крохмалю, що піддався гідролізу, знаходиться у зазначених межах (0,02 – 0,06 г), дані, що були отримані вище, використовують для визначення амілолітичної активності.

3.3.2. Визначення амілолітичної активності ферментного препарату бактеріального походження

Амілолітичну активність препарату (АА) в од/г обчислюють за формулою:

$$AA = \frac{5,885 \cdot C + 0,001671}{\Pi} \cdot 1000$$

де С – кількість крохмалю, що піддався гідролізу, г;

П – кількість препарату, яка повинна міститися в 5 см³ розбавленого розчину, мг;

1000 – коефіцієнт переведення мг в г.

Подальший розрахунок виконують, користуючись таблицею додатку 1 для препаратів бактеріального походження.

Пояснення до користування таблицею. За оптичними густинами D_1 і D_2 , що отримані в результаті колориметрування, знаходять значення кількості крохмалю, що піддався гідролізу С.

Графа 1 табл. додатку 1 являє собою різні значення кількості крохмалю, що піддався гідролізу, значення С помножене на 1000.

У графі 2 розташовані числа, що відповідають кожному значенню з першої граfi, вони являють собою цілком чисельник розрахункового рівняння: $5885 \cdot C + 1,671$.

Для отримання величини амілолітичної активності, знаходять в графі 1 значення С і по ньому в графі 2 відповідне число. Останнє ділять на П (в мг) і отримують величину АА препарату в од/г.

Приклад. На аналіз беруть наважку 0,1 г ферментного препарату амілолітичної дії, кількісно переносять в мірну колбу на 100 см³ і об'єм доводять дистильованою водою до мітки. Припускають, що амілолітична активність препарату 5000 од. В третьому стовпчику табл. 2.1 знаходять об'єм вихідного розчину ферменту (см³), що необхідний для приготування робочого розчину об'ємом 200 см³. Він дорівнює 2 см³. Тоді в 5 см³ робочого розчину, який використовується при проведенні ферментативної реакції, буде міститися 0,05 мг препарату (П).

В результаті аналізу отримано наступні значення оптичних густин: $D_1 = 0,520$ – для контрольного розчину; $D_2 = 0,320$ – для випробувального розчину.

Використовуючи отримані величини оптичних густин, визначають кількість крохмалю, що піддався гідролізу, за п. 2.5.1.

$$C = \frac{0,520 - 0,320}{0,520} \cdot 0,1 = 0,038$$

Далі роблять наступну дію:

$$0,038 \cdot 1000 = 38$$

У першій графі табл. додатку 1 знаходять число $C \cdot 1000$, що відповідає прикладу розрахунку і дорівнює 38. У другій графі табл. додатку 1 цьому числу відповідає величина 225,30. Підставляючи це значення в рівняння для визначення амілолітичної активності, отримують значення АА (в од/г):

$$AA = \frac{225,30}{0,05} = 4506 \text{ од/г.}$$

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте поняття амілолітичної активності ферментних препаратів.
2. Охарактеризуйте поняття одиниці амілолітичної активності ферментних препаратів.
3. Опишіть методику приготування основного розчину ферментного препарату.
4. Опишіть методику приготування робочого розчину ферментного препарату.
5. Опишіть методику приготування розчину крохмалю.
6. Опишіть методику приготування фосфатного буферного розчину з рН 6,0.
7. Опишіть методику приготування основного розчину йоду.
8. Опишіть методику приготування робочого розчину йоду.
9. Опишіть методику проведення основного випробування при визначенні амілолітичної активності ферментних препаратів.
10. Яким чином визначають кількість крохмалю, що піддався гідролізу?
11. За якою формулою обчислюють амілолітичну активність ферментних препаратів?

4. ДОСЛІДЖЕННЯ АДСОРБЦІЙНИХ СПОСОБІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ

Мета роботи: навчитися визначати адсорбційну ємність носіїв для іммобілізації ферментів, проводити іммобілізацію ферментів статичним і динамічним способами, оцінювати якість отриманих біокатализаторів.

План заняття

1. Ознайомитися з теоретичною частиною та зробити стислий конспект.
2. Виконати практичну частину роботи щодо визначення адсорбційної ємності носіїв для іммобілізації ферментів, іммобілізації ферментів статичним і динамічним способами, визначення активності отриманих біокатализаторів.
4. Зробити висновок за отриманими результатами.

Іммобілізація ферментних препаратів

Іммобілізація – це спосіб, при якому молекулу біокатализатора включають до будь-якої фази, що відділена від фази вільного розчину, але здатна обмінюватися з ним молекулами субстрату та продукту (іншими словами, прикріплення ферменту до деякого нерозчинного носія).

Для отримання іммобілізованих ферментів використовується велика кількість носіїв, як органічних, так і неорганічних. Основні вимоги, що пред'являються до матеріалів, що можуть бути використані для іммобілізації ферментів:

- висока хімічна та біологічна стійкість;
- висока механічна стійкість (в першу чергу, до стирання);
- достатня проникність для субстратів та ферменту, велика питома поверхня, висока місткість, пористість;
- можливість отримання зручних у технологічному відношенні форм (гранул, мембран, труб, листів та ін.);
- легка активація;
- висока гідрофільність, яка забезпечує можливість проведення реакції зв'язування ферменту з носієм, що задовольняє одночасно всім цим вимогам.

Відомо 2 групи способів іммобілізації ферментів:

- фізичні, в яких немає зв'язування ферменту з носієм ковалентними зв'язками;

- хімічні, при використанні яких між ферментом і носієм виникає ковалентний зв'язок.

Всі способи фізичної іммобілізації можна розділити на чотири групи:

- адсорбція на нерозчинних носіях;
- включення в пори гелю;
- просторове відділення ферменту від іншого об'єму реакційної системи за допомогою напівпроникної перегородки (мембрани);
- включення у двофазне реакційне середовище, де фермент розчиняється і може знаходитися тільки в одній з фаз.

Найбільш поширені і прості способи – це іммобілізація на нерозчинних носіях шляхом адсорбції. Існує два варіанти адсорбції: статичний і динамічний (з перемішуванням) способи.

Статичний спосіб. Найбільш простий і полягає в тому, що носій вносять у водний розчин ферменту і одержану суміш залишають на деякий час без перемішування. Іммобілізація досягається за рахунок самовільної дифузії. Недолік способу – тривалий час проведення (кілька діб).

Динамічний спосіб (із перемішуванням) часто застосовують у лабораторній практиці. За цим способом носій розмішують в розчині ферменту і отриману суміш безперервно перемішують за допомогою магнітної мішалки або любим іншим способом. Цей спосіб більш ефективний, забезпечує більш рівномірне заповнення поверхні носія адсорбованим ферментом.

Прилади й устаткування, реактиви та матеріали

- Фотоелектроколориметр зі світлофільтрами з довжиною хвилі в інтервалі 434-450 та 656-670 нм зі скляними кюветами з товщиною світлопоглинаючого шару 10 мм.

- Цетрифуга лабораторна.
- рН-метр лабораторний або іономер універсальний.
- Ваги лабораторні загального призначення з найбільшою межею зважування 200 г, з ціною поділки 0,1 мг.
- Термометр ртутний скляний лабораторний з інтервалом виміру 0–55 °С, ціною поділки 0,1 °С.
- Склянки лабораторні місткістю 25, 50 см³.
- Колби мірні 2-го класу точності, місткістю 25, 50, 100, 200 см³, 1 дм³.
- Піпетки місткістю 1, 2, 5, 10, 25 см³.
- Пробірки діаметром 14-16 мм.

- Склянки для зважування.
- Ферментний препарат амілолітичної дії бактеріального походження.
- Носії для іммобілізації різної природи (активоване вугілля, іонообмінна смола, окис алюмінію).
- Крохмаль розчинний, розчин з концентрацією 10 г/дм³.
- Натрій фосфорнокислий двозаміщений (Na_2HPO_4), розчин з концентрацією 1/15 моль/дм³.
- Калій фосфорнокислий однозаміщений (KH_2PO_4), розчин з концентрацією 1/15 моль/дм³.
- Кислота соляна, розчин з концентрацією 0,1 моль/дм³.
- Йод кристалічний.
- Калій йодистий (KJ).
- індикатор метиловий жовтогарячий, розчин із масовою концентрацією 1500 мг/дм³.
- Води дистильована.
- Папір фільтрувальний лабораторний.
- Баня водяна або ультратермостат.

Хід роботи

4.1. Визначення адсорбційної ємності носіїв для іммобілізації

Визначення адсорбційної ємності носіїв для іммобілізації проводять за допомогою індикатора метилового жовтогарячого.

4.1.1. Підготовка до випробування – побудова градуювального графіку

0,3 г індикатору метилового жовтогарячого зважують (результат зважування у грамах записують до третього десяткового знаку), переносять у мірну колбу об'ємом 200 см³ і розчиняють у 50 см³ гарячої дистильованої води. Після розчинення метилового жовтогарячого розчин індикатору охолоджують до 20 °С, доводять дистильованою водою до мітки, добре перемішують. Робочий розчин треба зберігати в герметично закритому посуді з темного скла не більше двох тижнів.

Для побудови градуювального графіку готують розчини порівняння. Для цього у сім мірних колб, об'ємом 50 см³ кожна, вводять 0,8; 1,0; 1,3; 1,6; 2,0; 2,3; 2,4 см³ розчину індикатора, після чого об'єм доводять водою температурою 20 °С до мітки. Одержані розчини містять в 1 см³ відповідно 24; 30; 39; 48; 60; 69; 78 мг/дм³ індикатору. Оптичну густину приготовлених розчинів порівняння

вимірюють на фотоелектроколориметрі при синьому світлофільтрі з $\lambda = 400$ нм у кюветах з товщиною поглинаючого шару 0,5 см. В якості контрольного розчину застосовують дистильовану воду. За отриманими даними будують графік залежності оптичної густини від масової концентрації розчинів порівняння.

4.1.2. Проведення випробування

Наважку носія для іммобілізації масою близько 1 г (результати зважування записують до третього знаку), яка подрібнюють згідно із завданням, кількісно переносять в конусну колбу об'ємом 50 см^3 , додають 25 см^3 розчину метилового жовтогарячого (з масовою концентрацією 1500 мг/дм^3), закривають пробкою і добре збовтують протягом 20 хвилин. Після збовтування вугільну суспензію переносять у пробірки для центрифугування та центрифугують протягом 15 хвилин. По закінченню центрифугування обережно піпеткою відбирають 5 см^3 освітленого розчину і визначають його оптичну густину на фотоелектроколориметрі. Якщо оптична густина освітленого розчину перевищує 0,8 оптичних одиниць, то 5 см^3 цього розчину переносять у мірну колбу, об'ємом 25 або 50 см^3 в залежності від оптичної густини. Розчин у колбі розводять дистильованою водою до мітки. Оптична густина розчину після розведення повинна бути в межах від 0,1 до 0,8 оптичних одиниць. Коефіцієнт розведення при цьому буде дорівнювати 5 або 10. За отриманим значенням оптичної густини, користуючись градууювальником графіком, визначають масову концентрацію індикатора в освітленому розчині.

4.1.3. Обробка результатів

Адсорбційну активність за індикатором (X) у міліграмах на 1 г продукту вираховують за формулою:

$$X = (C_1 - C_2 \cdot K) \cdot 0,025 / m,$$

де C_1 – масова концентрація вихідного розчину індикатора, мг/дм^3 ;

C_2 – масова концентрація розчину після контактування з активованим вугіллям, мг/дм^3 ;

K – коефіцієнт розбавлення розчину, що взяли для аналізу, після контактування з носієм;

m – маса наважки носія, г;

0,025 – об'єм розчину індикатора, що взяли для освітлення, дм^3 .

За результат аналізу беруть середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, абсолютна розбіжність між якими не повинна перевищувати допустимої розбіжності, яка дорівнює 10 мг на 1г продукту.

Результат цього визначення беруть до уваги при іммобілізації ферменту. Для дослідження беруть таку кількість ферменту, яку може адсорбувати на собі ця фракція носія, тобто X мг на 1 г носія.

4.2. Дослідження статичного та динамічного способів іммобілізації ферментних препаратів на носіях

4.2.1. Іммобілізація ферментів

Іммобілізацію ферментів проводять двома способами: статичним та динамічним з перемішуванням.

Дві наважки носія згідно з варіантом масою 1 г кожна пересипають у 2 склянки об'ємом 50 см³ (або пробірки). В одному проводять адсорбцію статичним способом в другому – з перемішуванням. В кожену склянку додають ферментний препарат у кількості, яку може адсорбувати дана фракція носія (X) та 30 см³ дистильованої води.

За статичним способом іммобілізацію проводять таким чином: в один із стаканчиків з наважкою додають фермент, розмішують з носієм додавши невелику кількість дистильованої води, залишають на кілька годин або діб у спокої.

Спосіб з перемішуванням потребує іммобілізації при постійному перемішуванні протягом певного часу (варіанти: 30 хвилин; 1 година, 2 години).

По закінченні визначеного часу визначають амілолітичну активність одержаного біокаталізатора.

4.2.2. Визначення амілолітичної активності одержаного біокаталізатора

По закінченню іммобілізації суспензію розділяють на фракції: носій з іммобілізованим ферментом і рідина. У одержаному біокаталізаторі (носій + іммобілізований фермент) визначають ферментативну активність за методикою, що описана у п. 2 даних методичних вказівок.

4.2.3. Обробка результатів

Результати визначення амілолітичної активності біокаталізаторів (носій + іммобілізований фермент) порівнюють з активністю чистого ферменту (неіммобілізованого). Порівнюють результати, що отримані при статичному і динамічному способах іммобілізації. Також порівнюють результати активності

при варіюванні часу іммобілізації при статичному способі, часу перемішування при динамічному способі, та при використанні різного ступеню подрібнення для певного носія.

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте поняття іммобілізації ферментів.
2. Які носії використовують для іммобілізації ферментів?
3. Охарактеризуйте вимоги, що ставлять до носіїв для іммобілізації ферментів.
4. Охарактеризуйте способи іммобілізації ферментів.
5. Охарактеризуйте статичний спосіб іммобілізації ферментів.
6. Охарактеризуйте динамічний спосіб іммобілізації ферментів.
7. Охарактеризуйте методику визначення адсорбційної ємності носіїв для іммобілізації ферментів.
8. Охарактеризуйте методику проведення іммобілізації ферментів статичним способом в лабораторних умовах.
9. Охарактеризуйте методику проведення іммобілізації ферментів динамічним способом в лабораторних умовах.
10. Охарактеризуйте методику визначення амілолітичної активності одержаного біокатализатора.

СПИСОК ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Fermentation and biochemical engineering handbook. Principles, Process Design, and Equipment / Ed. by Henry C. Vogel, Celeste M. Todaro. Waltham : Elsevier Inc., 2014. 455 p.
2. ДСТУ 8453:2015 Препарати ферментні. Методи визначення амілолітичної активності. [Чинний від 2017-07-01]. Вид. офіц. Київ : ДП «УкрНДНЦ», 2018. 16 с.
3. Капрельянц Л.В. Ферменты в пищевых технологиях. Одеса : Друк, 2009. 468 с.
4. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. 324 с.

ДОДАТОК 1

Дані для розрахунку АА в препаратах бактеріального походження

Відсоток гідролізу крохмалю (С · 1000)	Чисельник розрахункового рівняння (5885 · С+1,671)	Відсоток гідролізу крохмалю (С · 1000)	Чисельник розрахункового рівняння (5885 · С+1,671)
20,25	120,84	27,25	162,04
20,50	122,31	27,50	163,51
20,75	123,78	27,75	164,98
21,00	125,26	28,00	168,45
21,25	126,73	28,25	167,92
21,50	128,20	28,50	169,39
21,75	129,67	28,75	170,86
22,00	131,14	29,00	172,34
22,25	132,61	29,25	173,81
22,50	134,08	29,50	175,28
22,75	135,55	29,75	176,75
23,00	137,03	30,00	178,22
23,25	138,49	30, 25	179,69
23,50	139,97	30,50	181,16
23,75	141,44	30,75	182,63
24,00	142,91	31,00	184,11
24,25	144,38	31,25	184,58
24,50	145,85	31,50	187,05
24,75	147,32	31,75	188,52
25,00	148,79	32,00	189,99
25,25	150,27	32,25	191,46
25,50	151,74	32,50	192,93
25,75	153,21	32,75	194,40
26,00	154,68	33,00	195,88
26,25	156,15	33,25	197, 35
26,50	157,62	33,50	198,82
26,75	159,09	33,75	200,29
27,00	160,57	34,00	201,76

Відсоток гідролізу крохмалю (С · 1000)	Чисельник розрахункового рівняння (5885 · С+1,671)	Відсоток гідролізу крохмалю (С · 1000)	Чисельник розрахункового рівняння (5885 · С+1,671)
34,25	203,23	42,25	250,31
34,50	204,70	42,50	251,78
34,75	206,17	42,75	253,25
35,00	207,65	43,00	254,72
35,25	209,12	43,25	256,19
35,50	210,59	43,50	257,67
35,75	212,06	43,75	259,14
36,00	213,53	44,00	260,61
36,25	215,00	44,25	262,08
36,50	216,47	44,50	263,55
36,75	217,94	44,75	265,02
37,00	219,42	45,00	266,49
37,25	220,89	45,25	267,97
37,50	222,36	45,50	269,44
37,75	223,83	45,75	270,91
38,00	225,30	46,00	272,38
38,25	226,77	46,25	273,85
38,50	228,24	46,50	275,32
38,75	229,71	46,75	276,79
39,00	231,18	47,00	278,27
39,25	232,66	47,25	279,74
39,50	234,13	47,50	281,21
39,75	235,60	47,75	282,68
40,00	237,07	48,00	284,15
40,25	238,54	48,25	285,62
40,50	240,01	48,50	287,09
40,75	241,48	48,75	288,56
41,00	242,96	49,00	290,04
41,25	244,43	49,25	291,51
41,50	245,90	49,50	292,98
41,75	247,37	49,75	294,45
42,00	248,84	50,00	295,92

Відсоток гідролізу крохмалю (С · 1000)	Чисельник розрахункового рівняння (5885 · С+1,671)	Відсоток гідролізу крохмалю (С · 1000)	Чисельник розрахункового рівняння (5885 · С+1,671)
50,25	297,39	55,25	326,82
50,50	298,86	55,50	328,29
50,75	300,33	55,75	329,76
51,00	301,81	56,00	331,21
51,25	303,28	56,25	332,70
51,50	304,75	56,50	334,17
51,75	306,22	56,75	335,65
52,00	307,69	57,00	337,12
52,25	309,16	57,25	338,59
52,50	310,63	57,50	340,06
52,75	312,10	57,75	341,53
53,00	313,58	58,00	343,00
53,25	315,05	58,25	344,47
53,50	316,52	58,50	345,94
53,75	317,99	58,75	347,41
54,00	319,46	59,00	348,89
54,25	320,93	59,25	350,36
54,50	322,40	59,50	351,83
54,75	323,87	59,75	353,30
55,00	325,35	60,00	354,77

Навчальне видання

Основи інженерної ензимології
Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт
з навчальної дисципліни «Загальна біотехнологія»
для здобувачів вищої освіти спеціальності
162 «Біотехнології та біоінженерія»

Укладач

ВАРАНКІНА Олександра Олександрівна

Відповідальний за випуск проф. Близнюк О. М.
Роботу до видання рекомендував проф. Пітак Я.М.

В авторській редакції

План 2024 р., поз. 1041.

Підп. до друку _____ Гарнітура Times New Roman.

Видавничий центр НТУ «ХП»,
вул. Кирпичова, 2, м. Харків,
61002

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 5478 від 21.08.2017 р.
Електронна версія