

Міністерство освіти і науки України
Львівський національний університет
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького

Кафедра біотехнології та радіології

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних робіт
з дисципліни «Біохімія мікроорганізмів»

для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня
за освітньо-професійною програмою
«Біотехнології та біоінженерія»
зі спеціальності: G₂₁ Біотехнології та біоінженерія
галузі знань G Інженерія, виробництво та будівництво

Львів – 2025

Укладач:

к.б.н., доцент **Теодор Гривул**

Рецензент:

к.б.н., доцент ЛНУВМБ ім. С.З. Гжицького

Віктор Галяс

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт із дисципліни «Біохімія мікроорганізмів» для студентів спеціальності G21 «Біотехнології та біоінженерія» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти усіх форм навчання розроблено на основі навчальних та робочих програм, затверджено на засіданні кафедри біотехнології та радіології (протокол № 23 від 03.03 2025 р.) та засіданні НМР факультету харчових технологій та біотехнології (протокол № 2 від 13.03.2025 р.).
Укладач Т. Гривул. Львів: ЛНУВМБ ім. С. З. Гжицького, 2025. 36 с.

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1. Загальні вказівки до виконання лабораторних робіт	6
1.1. Основні правила роботи та вимоги з техніки безпеки.....	6
1.2. Заходи з надання першої медичної допомоги при нещасних випадках.....	8
2. Визначення інтегральних параметрів енергетичного статусу.....	11
3. Виявлення деяких інтермедіатів основних шляхів обміну, які є попередниками будівельних блоків.....	15
4. Виявлення деяких основних будівельних блоків та вторинних метаболітів	20
5. Визначення активності деяких гідролітичних екзоензимів у ензимних препаратах	25
Список використаної літератури.....	36

ВСТУП

Використання мікроорганізмів для отримання протеїну, вторинних метаболітів, вітамінів, екзогенних ензимів та інших сполук зумовлене великою швидкістю їх розмноження, використанням дешевої сировини для вирощування і можливістю регулювати інтенсивність катаболічних і анаболічних процесів.

Більшість органічних субстратів, які використовуються бактеріями, це полімери рослинного походження. За хімічною будовою – це макромолекули, які не здатні проникати через плазматичну мембрану бактерій. Тому на першому етапі вони розщеплюються екзогенними гідролазами, які виділяються бактеріями і перебувають на поверхні клітин. Деякі поверхневі гідролази локалізовані в спеціальних великих структурах, які дуже споріднені як до клітин, так і до субстрату, тому відповідальні за їх зв'язування. Окремі гідролази екскретуються у розчинній формі – це так звані екзоензими. Цей клас ензимів широко застосовується у промислових технологіях.

Деградація макромолекул лімітована наявністю позаклітинних ензимів. Їх є багато і вони різноманітні відповідно різноманітності атакованих субстратів і середовищ. Реакції здійснювані позаклітинно, як правило, є лімітуючими стадіями деградації полімерів. Це тому, що рослинні полімери хімічно стійкі структури, які володіють кристалічністю і малою розчинністю у воді.

Продукти розщеплення полімерів – мономерні та олігомерні сполуки є водорозчинними, тому вже проникають у клітину, де розщеплюються в центральних метаболічних шляхах: **гліколізі, циклу трикарбонових кислот і пентозофосфатному циклі**, які забезпечують спряження процесів деградації з процесами біосинтезу через утворення пулу центральних метаболітів-попередників для синтезу будівельних блоків.

Продукти розщеплення полімерів спочатку перетворюються в реакціях взаємоперетворень в типові субстрати центральних метаболічних шляхів. **Ця частина метаболізму називається периферійною і включає такі реакції:** фосфорилювання, фосфороліз глікозидів, кетоенольна ізомеризація, окиснення і відновлення, альдольне розщеплення.

Реакції розщеплення органічних субстратів, з одного боку, забезпечують клітину енергією, а з іншого – є джерелом утворення всіх молекул-попередників для процесів біосинтезу. І наостанок для всіх процесів синтезу компонентів клітини потрібні затрати енергії (найчастіше – це АТФ) і відновлювачі – НАДФН, основним джерелом якого є окиснювальний пентозофосфатний цикл. АТФ витрачається, в основному, на синтез протеїнів і НК, а НАДФН – на синтез протеїнів і ліпідів.

Окисно-відновні реакції центральних метаболічних шляхів, які є джерелом енергії протікають із зміною вільної енергії, тобто є екзергонічними і спряжені з синтезом АТФ шляхом субстратного фосфорилування (бродіння) або електронтранспортного фосфорилування (аеробне і анаеробне дихання).

1. ЗАГАЛЬНІ ВКАЗІВКИ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1.1. ОСНОВНІ ПРАВИЛА РОБОТИ ТА ВИМОГИ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

Загальні положення

Кожен студент зобов'язаний:

- 1) бути атестованим зі знання норм, правил та інструкцій безпеки;
- 2) отримати у свого викладача інструктаж з обов'язковим записом у журналі інструктажу з техніки безпеки (далі – ТБ);
- 3) не порушувати правила ТБ і внутрішнього розпорядку;
- 4) не чіпати і не включати без дозволу викладача чи старшого лаборанта електроприлади;
- 5) виконувати тільки доручену йому роботу;
- 6) не залишати свою роботу без нагляду з метою уникнення небезпечних ситуацій;
- 7) обережно працювати з приладами та скляним посудом.

Студенту заборонено:

- 8) працювати одному в лабораторії;
- 9) знаходитися у лабораторії у верхньому одязі;
- 10) пробувати хімічні речовини на смак;
- 11) виливати у раковини залишки реактивів, вогнетривких і отруйних речовин; вказані речовини необхідно зливати у спеціальні посудини.

Вимоги ТБ перед початком робіт

- 1) в лабораторії одягати робочий одяг (халат і шапочка);
- 2) оглядати робоче місце і прибрати предмети, які не стосуються роботи;
- 3) оцінити освітленість робочого місця (чи сліпить очі і чи його достатньо);
- 4) переконатися у справності обладнання, необхідного для виконання роботи;
- 5) перед початком роботи ознайомитися із завданням, матеріалами та приладами.

Вимоги ТБ під час виконання робіт

1) всі роботи з кислотами та лугами проводити у захисних окулярах та гумових рукавичках;

2) розводити сульфатну кислоту тільки у термостійкій посудині **(Увага! доливати кислоту до води, а не навпаки);**

3) розчиняти гідроксиди натрію і калію треба дуже повільно шляхом додавання їх до води невеликими порціями. Тверді лути брати тільки кусачками, а не руками;

4) всі роботи з відбору нітратної, сульфатної та хлоридної кислот виконувати під витяжною шафою у захисних окулярах.

Вимоги ТБ після завершення робіт

1) впорядкувати своє робоче місце;

2) після виконання роботи повідомити викладача чи старшого лаборанта про завершення дорученої роботи;

3) перед відходом із лабораторії вимкнути електричні прилади, виключити газові пальники і помити посуд.

У випадку пожежі переконатися у власній безпеці, терміново викликати пожежну частину за телефоном 101 та приступити до її гасіння наявними засобами пожежогасіння.

У всіх випадках виконувати вказівки керівника робіт для ліквідації наслідків аварії.

1.2. ЗАХОДИ З НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ ПРИ НЕЩАСНИХ ВИПАДКАХ

Перша допомога при ураженні електричним струмом

При ураженні електричним струмом необхідно якнайшвидше визволити потерпілого від дії електричного струму, виключивши електроприлад від джерела струму, а при неможливості відключення – відтягнути його від струмопровідних деталей за одягу, або застосувати підручний ізоляційний матеріал.

При відсутності у потерпілого дихання та пульсу необхідно зробити штучне дихання та непрямий масаж серця, звертаючи увагу на зіниці. Розширені зіниці свідчать про різке погіршення кровообігу мозку. У такому стані необхідно негайно починати оживлення і викликати швидку медичну допомогу.

Перша допомога при пораненнях

При порізах битим скляним лабораторним посудом, рану очистити від уламків скла стерильним пінцетом або стерильною марлею. Накласти на рану стерильний перев'язувальний матеріал із індивідуального пакету і перев'язати його бинтом. За відсутності індивідуального пакету, можна перев'язати чистим матеріалом (носовою хусточкою, чистою полотняною ганчіркою і т.п.). При забруднених ранах можна на місце у пов'язці, яке припадатиме на рану накапати декілька крапель йоду, щоб отримати пляму розміром більшим, ніж рана.

Перша допомога при вивихах, переломах, ударах

При переломах та вивихах кінцівок необхідно укріпити пошкоджене місце шиною, фанерною пластиною, палицею, картоном, або іншим подібним предметом. Пошкоджену руку можна також підвісити за допомогою перев'язки або хустки до шиї та прибинтувати до тіла.

При переломі черепа за неусвідомленого стану після удару по голові (спостерігається кровотеча з вух, рота) прикласти до голови холодний предмет (грілку з льодом, або снігом, чи холодною водою), або зробити холодну примочку.

При підозрі на перелом хребта необхідно потерпілого покласти на дошку не підіймаючи його і повернути на живіт обличчям вниз. З метою уникнення пошкодження спинного мозку, не дозволяти тілу перехилитись.

При переломі ребер (характеризується болем при диханні, чханні, кашлю та рухах) необхідно туго забинтувати грудну клітку, або стягнути її рушником під час видиху.

Перша допомога при опіках кислотами або лугами

При потраплянні кислоти або лугу на шкіру необхідно:

- зменшити концентрацію діючого чинника шляхом змивання його водою впродовж 5-10 хвилин;
- нейтралізувати залишки чинника, а саме: поверхню пошкоджену кислотою промити 5% розчином соди, а поверхню пошкоджену лугом промити 5% розчином оцтової чи борної кислоти;
- змити продукти нейтралізації водою впродовж 5-10 хвилин.

При потраплянні кислоти або лугу на слизові оболонки очей необхідно:

- зменшити концентрацію діючого чинника шляхом змивання його водою впродовж 5-10 хвилин;
- нейтралізувати залишки чинника, а саме: при попаданні кислоти промити 2% розчином соди, а при попаданні лугу промити 2% розчином борної кислоти;
- змити продукти нейтралізації водою впродовж 5-10 хвилин.

При потраплянні кислоти або лугу на слизові оболонки ротової порожнини необхідно:

- зменшити концентрацію діючого чинника шляхом полоскання рота водою впродовж 5-10 хвилин;
- нейтралізувати залишки чинника, а саме: при попаданні кислоти промити 5% розчином соди, а при попаданні лугу промити 3% розчином оцтової або борної кислоти;
- прополокати рот водою.

Перша допомога при теплових опіках

При опіку вогнем, парою чи гарячими предметами не можна розкривати утворені пухирі та перев'язувати їх бинтом.

При опіку першого ступеня (почервоніння) обпечене місце охолодити водою і накласти бинт на місце опіку. При опіку другого ступеня (пухирі) обпечене місце промити прохолодною водою, нанести тонким шаром протиопіковий гель зі знеболюючим ефектом і накласти бинт. При опіку третього ступеня (пошкодження шкірної тканини) рану накривають стерильною пов'язкою і викликають лікаря.

Перша допомога при кровотечі

Підняти поранену кінцівку вгору.

Рану закрити перев'язувальним матеріалом (із пакету) складеним у клубок, притиснути його зверху не торкаючись країв рани і протримати 4-5 хвилин. Якщо кровотеча зупинилася, тоді, не знімаючи перев'язувального матеріалу, поверх нього накласти ще одну подушечку із другого пакету, або шматок вати та, притискаючи, забинтувати поранене місце.

Якщо кровотечу неможливо зупинити пов'язкою, стискати кровоносні судини, котрі насичують поранену область шляхом згинання суглобів, а також пальцями, жгутом, турнікетом або затискачем. У разі сильної кровотечі необхідно викликати лікаря.

2. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕГРАЛЬНИХ ПАРАМЕТРІВ ЕНЕРГЕТИЧНОГО СТАТУСУ

Теоретичні відомості

Всі біохімічні реакції, які протікають у клітині називаються метаболізмом. Умовно вони розділяються на два типи: процеси **катаболізму, або енергетичного обміну і анаболізму, або синтетичних процесів. Перший** забезпечує синтез АТФ із АДФ і неорганічного фосфору, **другий** – забезпечує синтетичні процеси енергією, тобто спряжений із гідролізом АТФ і вивільненням або АДФ і неорганічного фосфору, або АМФ і пірофосфату. В залежності від рівня неорганічного фосфору та АТФ можна характеризувати енергетичний статус.

Аденозинтрифосфорна кислота займає центральне місце не тільки в енергетичному метаболізмі а у всьому обміні речовин і побудована із аденіну, рибози і трьох залишків фосфорної кислоти. АТФ є універсальним джерелом енергії для реакцій обміну в організмі. Наприклад для гліколітичних реакцій організм людини за добу витрачає приблизно 0,5 кг АТФ. При дефосфорилюванні 1 моля АТФ вивільняється 8000-10000 калорій енергії. Для здійснення синтетичних процесів постійно витрачається АТФ, тому і постійно відбувається її синтез в екзергонічних окисно-відновних процесах, які спряжені із фосфорилюванням – субстратним або окиснювальним. АТФ наявна в органах та тканинах всіх біологічних об'єктів. У навчальних дослідженнях найбільш придатним об'єктом є м'язи, рівень АТФ в яких може досягати 30,0-45,0 мг%. Утворення АТФ в них може проходити ще і внаслідок переносу фосфатної групи з креатинфосфату на АДФ а також внаслідок міокіназної реакції, в якій із двох молекул АДФ утворюється АТФ і АМФ.

Найширшого застосування для визначення рівня неорганічного фосфору набуло використання різних модифікацій методу Фіске-Субарроу.

Принцип методу. Молібденовокислий амоній у кислому середовищі приєднує фосфатний йон з утворенням фосфорнокислого амонію, який відновлюється з утворенням продуктів забарвлених у синій колір (молібденова синь). Інтенсивність забарвлення є пропорційною вмісту фосфору у досліджуваному об'єкті. В якості відновника фосфорнокислого амонію використовують ейконоген (α -1.2.4-амінонафтилсульфонова кислота), гідрохінон, аскорбінову кислоту та інші відновники.

Лабораторна робота

Дослід 1. Визначення рівня неорганічного фосфору у біологічному матеріалі

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1) культуральна рідина; | 9) фотоелектроколориметр; |
| 2) штатив з пробірками на піпетки; | 10) піпетки на 1.0 мл – 2 шт.; |
| 3) 2.5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ у 5N H_2SO_4 ; | 11) піпетки на 2.0 мл – 1 шт.; |
| 4) 20.0% ТХО; | 12) піпетки на 5.0 мл – 2 шт.; |
| 5) стандартний розчин KH_2PO_4 ; | 13) піпетки на 10.0 мл – 2 шт.; |
| 6) паперові фільтри | 14) лійки – 2 шт.; |
| для швидкої фільтрації; | 15) мірна колба на 50.0 мл – 2 шт.; |
| 7) паперові фільтри | 16) мірна колба на 100.0 мл – 1 шт.; |
| для середньої фільтрації; | 17) мірна колба на 1.0 л – 1 шт.; |
| 8) 0.5% аскорбінова кислота; | 18) хлороформ. |

Приготування реактивів

- 2.5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ у 5N H_2SO_4 (2.5 г молібденовокислого амонію розчиняють у 50.0 мл 10N H_2SO_4 і доводять водою до 100.0 мл.).
- стандартний розчин фосфору, що містить 0.04 мг Р в 1.0 мл. (0.1757 г KH_2PO_4 розчиняють в 1.0 літровій мірній колбі і доливають 5.9 мл хлороформу).

Хід роботи. В суху чисту пробірку наливають 2.0 мл культуральної рідини, 5.5 мл дистильованої води і 2.5 мл 20% розчину ТХО. Вміст пробірки ретельно перемішують і через 5 хв фільтрують через фільтр швидкої фільтрації. При наявності незначної муті проводять повторне фільтрування вже через фільтр середньої фільтрації.

Беруть 5.0 мл фільтрату (що відповідає 1.0 мл культуральної рідини) і переносять у мірну колбочку на 50.0 мл, а в другу колбочку наливають 1.0 мл стандартного розчину KH_2PO_4 . В обидві колбочки одночасно добавляють по 1.0 мл молібденовокислого амонію і 1.0 мл 0.5% аскорбінової кислоти. Потім вміст колбочок доводять водою до мітки і ставлять у затемнене місце на 10-15 хв.

Після того як розчин набув виразного синього забарвлення його колориметрують згідно інструкції до апарату при довжині хвилі 670 нм (червоний світлофільтр).

Вміст фосфору (X мг%) вираховують за формулою:

$$X = E_1 \times A \times 200 / E_2 \text{ мг\%,}$$

де: E_1 – екстинція робочої проби,

E_2 – екстинція стандартної проби,

A – кількість мг фосфору у стандартній пробі.

Примітка: При визначенні вмісту фосфору у мікробіальній масі її попередньо мінералізують. При визначенні у пресованих дріжджах із них готують 0.1% суспензію.

Дослід 2. Визначення аденозинтрифосфornoї кислоти (метод Сопіна)

Принцип методу. Аденозинтрифосфornoна кислота в кислому середовищі при кип'ятінні протягом 7-10 хв розпадається із вивільненням ортофосфornoї кислоти. Про наявність у досліджуваному об'єкті АТФ роблять висновок за кількістю звільненого неорганічного фосфору.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1) пресовані дріжджі; | 13) фарфорова чашка; |
| 2) 2.5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ у 5N H_2SO_4 ; | 14) 6.0% ТХО; |
| 3) магнезіальна суміш; | 15) 2N HCl ; |
| 4) стандарт Р (2.0 мг в 1.0 мл); | 16) 2N KOH ; |
| 5) 0.5% аскорбінова кислота; | 17) лійка; |
| 6) розчин фенолфталеїну; | 18) піпетка на 1.0 мл – 2 шт.; |
| 7) мірні пробірки на 10.0 мл; | 19) піпетка на 2.0 мл – 2 шт.; |
| 8) бюретка на 10.0 мл; | 20) піпетка на 10.0 мл – 1 шт.; |
| 9) фотоелектроколориметр; | 21) штатив; |
| 10) кип'яча водяна ванна; | 22) центрифуга; |
| 11) електроплита; | 23) пробірки; |
| 12) паперові фільтри для швидкої
фільтрації; | 24) фарфоровий пестик; |
| | 25) торзійна вага. |

Приготування реактивів.

- 2.5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ у 5N H_2SO_4 – (2.5 г молібденовокислого амонію розчиняють у 50.0 мл 10N H_2SO_4 і доводять водою до 100.0 мл.).
- магнезіальна суміш (розчиняють у воді 100.0 г MgCl_2 , 200 г NH_4Cl , і 20.0 мл конц. розчину аміаку і доводять водою до 1 л.).

Хід роботи. Готують наважку пресованих дріжджів масою до 1.0 г і розтирають у фарфоровій чашці. До розтертої маси доливають 20.0 мл 6%-го розчину ТХО і ретельно перемішують; наливають у пусту пробірку 4-5 мл суміші і залишають при кімнатній температурі на 1 годину, а потім фільтрують через паперовий фільтр для швидкої фільтрації.

У 10.0 мл 4 центрифужні пробірки наливають по 2.0 мл магнезіальної суміші і доливають 2.0 мл фільтрату, додають 1-2 краплі фенолфталеїну і нейтралізують за допомогою бюретки до слаборожевого забарвлення за допомогою 2N КОН. Розчин залишають на 3-4 години, але можна і на всю ніч. За цей час повністю руйнується креатинфосфат і гексозофосфати. Звільнений неорганічний фосфат осаджується магнезіальною сумішшю. Розчин центрифугують 20-25 хв. при 2500-3000 об/хв. В контрольну пробірку замість трихлороцтового фільтрату береться 2.0 мл 6.0% ТХО кислоти і 2.0 мл магнезіальної суміші.

2.0 мл надосадової переносять у суху мірну пробірку і доливають 2.0 мл 2N HCl і ставлять на 10 хв у киплячу водяну ванну. До рідини у контрольній пробірці додають 2.0 мл стандартного розчину KH_2PO_4 з концентрацією фосфору 2.0 мг в 1.0 мл. Після гідролізу розчин охолоджують нейтралізують за фенолфталеїном 2N КОН до слаборожевого забарвлення. В обидві пробірки одночасно добавляють по 1.0 мл молібденовокислого амонію і 1.0 мл 0.5% аскорбінової кислоти. Потім вміст пробірок стандартизують за об'ємом до мітки і ставлять у затемнене місце на 10-15 хв.

Пробірки ставлять на 10-15 хв у затемнене місце після цього фотометрують згідно інструкції до апарату при довжині хвилі 670 нм (червоний світлофільтр).

Довідкові дані для розрахунків

1. в 1.0 мл контрольного фотометрованого розчину міститься 0.5 мг Р.
2. 1.0 мл дослідного фотометрованого розчину, еквівалентний 1/80 частці наважки.

3. ВИЯВЛЕННЯ ДЕЯКИХ ІНТЕРМЕДІАТІВ ОСНОВНИХ ШЛЯХІВ ОБМІНУ, ЯКІ Є ПОПЕРЕДНИКАМИ БУДІВЕЛЬНИХ БЛОКІВ

Теоретичні відомості

Для синтезу макромолекул клітини потрібні основні будівельні блоки, які синтезуються із інтермедіатів центральних метаболічних шляхів: циклу трикарбонових кислот, гліколізу (або подібних шляхів розщеплення вуглеводів) та пентозофосфатного циклу. Таких центральних метаболітів-попередників є дванадцять, зокрема: глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, рибозо-5-фосфат, еритрозо-4-фосфат, гліцерол-3-фосфат, 3-фосфогліцерат, піруват, фосфоенопіруват, ацетил-КоА, оксалоацетат і 2-оксоглутарат. Субстратом для синтезу цих інтермедіатів, в основному, є глюкоза, а решта моноцукрів становлять незначну частку.

Серед інтермедіатів-попередників будівельних блоків 25% становлять кетокислоти (піровиноградна, 2-оксоглутарова і щавелевооцтова). Вони характеризуються неоднаковою хімічною стійкістю, наприклад: 2-оксоглутарова дуже стабільна, а щавелевооцтова у розчині швидко і «спонтанно» розщеплюється з виділенням CO_2

Лабораторна робота

Дослід 1. Визначення окремих кетокислот та їх суми

Принцип методу. Загальноприйнятим методом визначення кетокислот є утворення заміщених фенілгідразонів. Кетокислоти і нейтральні карбонільні сполуки утворюють із фенілгідразином відповідні гідразони, які переважно погано розчиняються у воді, але легко екстрагуються і концентруються із водного реакційного середовища органічними розчинниками, зокрема етилацетатом.

Гідразони кетокислот легко відділяються від гідразонів нейтральних карбонільних сполук шляхом екстракції водним розчином соди.

Кількісне фотометричне визначення отриманих фенілгідразотнів ґрунтується на інтенсивному оранжевому або червоному забарвленні, яке дають фенілгідразони в лужному середовищі. Метод високочутливий і специфічний.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1) матеріал для досліджень; | 11) 10% -ва-ТХО; |
| 2) гідразиний реактив; | 12) 5%-ва ТХО; |
| 3) водяна ванна; | 13) пробірки на 15 мл – 4 шт.; |
| 4) шутель-апарат; | 14) піпетка на 1.0 мл -2 шт.; |
| 5) корки до пробірок; | 15) піпетка на 2.0 мл – 2 шт.; |
| 6) фотоелектроколориметр; | 16) піпетка на 5 мл - 3 шт. |
| 7) піпетка на 5 мл з відтягнутим носиком; | 17) 0.1N H_2SO_4 ; |
| 8) етилацетат; | 18) 1M Na_2CO_3 ; |
| 9) стандарт кетокислоти; | 19) 1M NaOH . |
| 10) 2N HCl ; | |

Приготування спеціальних реактивів. 0.1% розчин 2.4-динітрофеніл-гідразину готують у 2N HCl , фільтрують і зберігають у холодильнику.

Стандартні розчини піровиноградної і 2-оксоглутарової кислот готують в 0.1N H_2SO_4 . Вони містять 0.25-6 мг кетокислоти у 100 мл розчину; зберігаються в холодильнику щонайменше 6 місяців.

Хід роботи

Метод А. (визначення суми кетокислот).

1. При визначенні кетокислот у культуральній рідині чи в екстракті із рослин спочатку осаджують протеїни 10% ТХО кислотою із розрахунку на 5% кінцеву концентрацію з подальшим фільтруванням або центрифугуванням.

2. 1.5 мл безпротеїнового екстракту вносять у 15 мл пробірку, якщо екстракту бракує, то до 1.5 мл доводять 5% ТХО кислотою і нагрівають у водяній ванні при 25°C 10 хвилин.

3. Додають 0.5 мл гідразинового реактиву і дають взаємодіяти рівно 25 хв.

4. Приливають 4.0 мл етилацетату (або дибутилового етеру) закривають корком і струшують за допомогою шутель-апарату.

Примітка: якщо проб небагато (3-5), то через суміш можна продувати повітря піпеткою з відтягнутим носиком або капілярною піпеткою Райта.

5. Видаляють нижній водяний шар за допомогою піпетки із відтягнутим носиком. Водяні краплі, що сформувалися на стінці пробірки об'єднують шляхом її крутіння руками і видаляють залишки водяної фази.

6. В пробірку доливають 3.0 мл прозорого (інакше треба фільтрувати) 1М Na_2CO_3 закривають корком і струшують за допомогою шутель-апарату. Після струшування залишають відстоюватися до чіткого поділу на два шари. Верхній шар утворений етилацетатом, а зафарбований нижній – це содовий розчин.

7. Піпеткою на 5 мл з відтягнутим носиком швидко протикають шар етилацетату (у випадку попадання етилацетату у відтягнутий носик його проштовхують) і втягують зафарбований содовий розчин, встановлюють меніск по мітці і 2.5 мл виливають у чисту 10 мл пробірку.

8. Доливають 2.5 мл 1.5 М NaOH перемішують і наливають у кювету фотометра і колориметрують з використанням світлофільтра з довжиною хвилі 420 нм проти «сліпої» проби.

Метод Б. (для визначення кетомонокарбонових кислот, наприклад піровиноградної). Цей метод відрізняється від методу А тільки тим, що тривалість реакції з гідразиновим реактивом становить 5 хвилин (замість 25 хвилин), а замість 4 мл етилацетату використовують 1.5 мл етилбензолу або бензолу.

Метод В. (для визначення кетодикарбонових кислот, наприклад 2-оксоглютарової) Цей метод відрізняється від методу А тим, що замість 4 мл етилацетату або дибутилового етеру використовують 4 мл бензилового спирту.

Дослід 2. Визначення молочної кислоти (метод Беркера і Соммерсона)

Одним із шляхів перетворення піровиноградної кислоти є її відновлення до молочної кислоти, накопичення якої спостерігається при катаболізмі вуглеводів.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| 1) 20% CuSO_4 ; | 8) льодова ванна; |
| 2) 4% CuSO_4 ; | 9) кип'яча ванна; |
| 3) 0.5% NaOH ; | 10) центрифуга; |
| 4) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ порошок; | 11) піпетки на 5.0 мл; |
| 5) конц. H_2SO_4 ; | 12) піпетка на 1.0 мл; |
| 6) параоксидифеніловий реактив; | 13) фотоелектоколориметр. |
| 7) широкі пробірки; | |

Приготування параоксидифенілового реактиву

1.5 г параоксидифенілу розчиняють в 100 мл 0.5% NaOH.

Хід роботи. В сухі широкі пробірки відміряють таку кількість фільтрату, яка містить 3-30 мкг молочної кислоти. Доливають дистильовану воду до об'єму 4.5 мл і додають 0.5 мл 20% CuSO_4 та близько 0.5 г $\text{Ca}(\text{OH})_2$, струшують і залишають на 30 хв., періодично струшуючи. Потім центрифугують і в суху пробірку відміряють 1 мл надосадової рідини. Вміщують пробірку у льодову ванну і при постійному струшуванні доливають 6 мл конц. H_2SO_4 .

Кип'ятять 5 хв., після чого охолоджують нижче 30° і доливають по одній краплі 4% CuSO_4 та параоксидифенілового реактиву. Швидко розмішують та інкубують при $28-30^\circ$ близько 30 хв. і для рівномірного розміщення реактиву періодично струшують. Нагрівають 90 секунд у кип'ячій воді, охолоджують і фотометрують при довжині хвилі 565 нм проти сліпої проби. Стандарт готують аналогічно.

Дослід 1. Визначення глюкози за Фелінгом

Більшість методів кількісного визначення глюкози ґрунтуються на реакціях окиснення за альдегідною групою з одночасним відновленням Cu^{2+} до Cu^{1+} . Тому цими реакціями можуть визначатися також інші редукуючі моно- і дисахариди. В реакції Фелінга відбувається складне окиснювальне розщеплення молекули цукру з утворенням декількох продуктів окиснення, зокрема: молочної, тартронової, глюконової та глюкуронової кислот.

Для визначення готують два розчини:

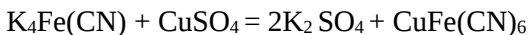
I. 69.28 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл води;

II. 346 г сегнетової солі ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{NaK} \times 4\text{H}_2\text{O}$) і 140.0 г NaOH у 1000 мл води.

Перед самим використанням готують розчин Фелінга шляхом змішування рівних об'ємів розчину I і розчину II. 1.0 мл такого розчину відповідає 0.005 г глюкози. Реактив Фелінга використовується також у методі Бертрана.

Хід роботи. В конічну колбу налити 20.0 мл розчину Фелінга і додати 80.0 мл води, нагрівати на сітці до кипіння і поступово із бюретки доливати (приблизно) 0.25% розчин глюкози. Під час доливання глюкози

підтримувати кипіння. Розчин глюкози доливати до повного зникнення голубого зафарбування. Оскільки, зникнення голубого забарвлення є непомітним, тому здійснюють індикаторну пробу. Для цієї проби краплю реакційної рідини капнути на молочно-біле скло підкислити оцтовою кислотою і додати краплю 10.0% калій-феро-111-гексаціаніду. В присутності солі оксиду купрум (II) утворюється коричнева пляма внаслідок утворення оксиду купруму феро-111-гексаціаніду.



Якщо для знебарвлення 20.0 мл розчину Фелінга використано 40.0 мл досліджуваного розчину глюкози, то в 100.0 мл розчину глюкози міститься:

$$0.005 \times 20 \times 100 // = 0.25 \text{ г.}$$

4. ВИЯВЛЕННЯ ДЕЯКИХ ОСНОВНИХ БУДІВЕЛЬНИХ БЛОКІВ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

Завдання 1. Виявлення деяких амінокислот

Теоретичні відомості

Найбільш важливими макромолекулами, для яких потрібен синтез будівельних блоків є: білки, нуклеїнові кислоти і пептидоглікан клітинної стінки. При цьому протеїни становлять майже 50% сухої речовини клітини, а НК становлять майже 20%. Основних будівельних блоків, із яких утворюються макромолекули клітин, налічується до 70-100.

Будівельні блоки потрібні клітині для таких процесів:

- оновлення компонентів клітини,
- репарація пошкоджень (наприклад ДНК),
- адаптація до змін довкілля, яка поєднує реакції біосинтезу і деградації.

Наявна інформації відноситься, в основному, до бактерій кишкової групи *Escherichia coli* і *Salmonella typhimurium*. **Найважливіші будівельні блоки** такі:

1. L-амінокислоти (мономери у складі протеїнів);
2. нуклеотиди (мономери у складі НК);
3. активовані цукри (для синтезу компонентів стінки клітин та інших структур);
4. жирні кислоти (або ізопреноїдні спирти в архей) в якості компонентів ліпідів.

Лабораторна робота

Дослід 1. Реакція Адамкевича на триптофан

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

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 1) 0.01% водний р-н триптофану; | 6) конц. H_2SO_4 ; |
| 2) льодова оцтова кислота; | 7) піпетки на 1.0 мл – 2 шт.; |
| 3) електроплита; | 8) пробірки на 15.0 мл; – 2 шт.; |
| 4) водяна баня; | 9) штатив. |
| 5) годинник; | |

Хід роботи. У дві пробірки вносять по 0,5 мл 0.01% водного розчину триптофану і додають 0,5 мл льодяної оцтової кислоти, яка завжди містить невелику кількість гліоксилової кислоти. Отриману суміш спочатку нагрівають, а потім охолоджують і по стінці пробірок обережно, по краплинам, щоб рідини не змішувалися, додають по 1.0 мл конц. H_2SO_4 .

Одну пробірку з реагуючою сумішшю залишають при кімнатній температурі, а другу ставлять у кип'ячу водяну ванну і фіксують час утворення червоно-фіолетового кільця на межі розподілу двох шарів.

Дослід 2. Реакція Фоля на сульфурвмісні амінокислоти

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

Під час кип'ятіння цистеїну та цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється Сульфур у вигляді сірководню, який в лужному середовищі утворює сульфід натрію. Останній виявляється за допомогою важких металів, наприклад йонів Плюмбуму, які утворюють з йонами Сульфуру нерозчинний сульфід плюмбуму. Для цього найкраще використовувати ацетат плюмбуму.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1) 0,01% водний розчин цистеїну; | 8) 10% NaOH ; |
| 2) реактив Фоля; | 9) 10% $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; |
| 3) водяна ванна; | 10) 1.0% розчин желатину; |
| 4) електроплита; | 11) конц. NaOH ; |
| 5) годинник; | 12) піпетки на 1.0 мл – 3 шт.; |
| 6) колбочка на 50.0 мл; | 13) піпетка на 2.0 мл – 1 шт.; |
| 7) піпетка на 10.0 мл – 1 шт.; | 14) штатив з пробірками. |

Приготування реактиву Фоля. Внести у 50.0 мл колбочку 20.0 мл 10% $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ і краплями додавати 10% NaOH до розчинення осаду, що утворився.

Хід роботи. В одну пробірку вносять 1.0 мл 0,01% водного розчину цистеїну, а в другу 1.0 мл 1.0% розчину желатину. В обидві пробірки вносять 2.0 мл конц. NaOH і по 1.0 мл реактиву Фоля. Суміш ретельно

перемішують і кип'ятять на водяній бані 2 хв. Через 3-5 хв спостерігають випадання бурого або чорного осаду сульфід у свинцю.

Дослід 3. Виявлення пуринових основ у складі нуклеопротейнів

Принцип методу. Метод ґрунтується на утворенні комплексів пуринових основ з солями аргентуму.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| 1) хлібопекарські сухі дріжджі; | 9) торзійна вага; |
| 2) гідролізат дріжджів; | 10) лійка; |
| 3) конц. розчин аміаку; | 11) паперові фільтри; |
| 4) 1% AgNO_3 ; | 12) кип'яча водяна ванна; |
| 5) 10.0% H_2SO_4 ; | 13) електроплита; |
| 6) 1.0% спиртовий р-н фенолфталеїну; | 14) піпетка на 5.0 мл – 1 шт.; |
| 7) лійка; | 15) піпетка на 1.0 мл – 2 шт.; |
| 8) колба із зворотним холодильником; | 16) піпетка на 10.0 мл – 2 шт. |

Приготування гідролізату нуклеопротейнів дріжджів. У крулодонну колбу поміщають 1.0 г сухих пекарських дріжджів, доливають 20.0 мл 10.0% H_2SO_4 і 20.0 мл дистильованої води. Колбу закривають корком із зворотним холодильником і нагрівають на слабкому вогні під тягою впродовж однієї години. Після гідролізу вміст колби охолоджують, гідролізат фільтрують.

Хід роботи. У пробірку вносять 1.0 мл нуклеопротейнів дріжджового гідролізату, додають концентрований розчин аміаку до одержання лужного середовища (за лакмусом) і 0.5 мл 1% AgNO_3 . Через 3-5 хвилин утворюється пухкий осад солей аргентуму пуринових основ.

Завдання 2. Виявлення антибіотиків

Теоретичні відомості

Процеси диференціації у мікроорганізмів включають морфологічну диференціацію і **хімічну диференціацію (вторинний метаболізм)**. Продукти вторинного метаболізму є специфічними для окремих штамів або групи штамів одного і того ж організму.

У природних умовах вторинні метаболіти мають значення для виживання мікроорганізму-продуцента, бо є антибіотиками, пігментами, феромонами або токсинами і виконують роль ефektorів екологічної конкуренції та симбіозу.

Синтез антибіотиків як і основних будівельних блоків здійснюється за участю інтермедіатів основного метаболізму. На даний час антибіотики знайшли широке використання в різних сферах, але найбільше у гуманній і ветеринарній медицині. Використання антибіотиків для стимуляції росту тварин та лікування причинило їх появу у тваринницькій продукції. Найчастіше антибіотики виявляються у такому дієтичному продукті, як молоко, для якого вони є чужорідними речовинами.

Лабораторна робота

Методи виявлення антибіотиків у молоці ґрунтуються на відновленні барвників резазурину або метиленового синього при розвитку у молоці чутливих до антибіотиків мікроорганізмів виду *Streptococcus thermophilus*. За цим методом можна виявити пеніцилін вмістом понад 0.06 мкг/мл, стрептоміцин – понад 30.0 мкг/мл, тетрациклін – від 10.0 мкг/мл і олендоміцин – від 10 мкг/мл.

Дослід 1. Виявлення антибіотиків у молоці

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1) молоко; | 7) термостат; |
| 2) 0.005% р-н резазурину; | 8) пробірки; |
| 3) 0.5% р-н метиленового синього; | 9) водяна ванна; |
| 4) стерильна піпетка на 1.0 мл – 1 шт.; | 10) піпетка на 10.0 мл – 1 шт.; |
| 5) мікропіпетка на 0.1 мл – 1 шт.; | 11) електроплита; |
| 6) культура бактерій <i>Streptococcus thermophilus</i> ; | 12) термометр на 100°C. |

Підготовка тест-культури. Колекційну культуру зберігають у мікробіологічній лабораторії при 6-8°C і пересівають через кожні 10-14 діб. У пробірку з 10.0 мл стерильного знежиреного молока вносять одну петлю тест-культури *Streptococcus thermophilus* і витримують у термостаті при 42-43°C протягом 16-18 годин. Для проведення аналізу використовують 1-2-добову культуру за умови зберігання її у холодильнику при 6-8°C.

Хід роботи. У чисту пробірку наливають 10 мл досліджуваного молока, закривають гумовим корком та нагрівають на водяній бані при 85-90°C протягом 10 хвилин, потім охолоджують до 42-45°C. Після цього у пробірку вносять стерильною піпеткою 0.3 мл робочої тест-культури.

Вміст пробірки ретельно перемішують 3-разовим перевертанням, після чого пробірку витримують у водяній ванні при температурі 42-43°C протягом 100-140 хвилин. Потім у пробірку вносять 1.0 мл розчину резузарину при температурі не нижче 18-20°C і ретельно перемішують. Пробірку з молоком і резузарином витримують при 42-43°C протягом 15 хвилин.

У випадку використання метиленового синього барвник вносять одночасно з робочою тест-культурою у кількості 0.1 мл 0.5% розчину.

За відсутності у молоці антибіотиків ензими, що виділяються тест-культурою *Streptococcus thermophilus*, відновлюють барвник; при цьому молоко стає білим або забарвлюється у рожевий колір. За наявності антибіотиків розвиток тест-культури інгібується і вона не виробляє ензимів, тому барвники не відновлюються. При цьому молоко забарвлюється: у випадку резазурину – від синьо-сталевого до синьо-фіолетового; у випадку метиленового синього – у блакитний колір. Блакитне кільце, що утворюється у пробірці на поверхні молока, не враховують.

5. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ДЕЯКИХ ГІДРОЛІТИЧНИХ ЕКЗОЕНЗИМІВ У ЕНЗИМНИХ ПРЕПАРАТАХ

Теоретичні відомості

Більшість потенціальних субстратів для росту бактерій – це нерозчинні органічні полімери, деградацію яких здійснюють позаклітинні ензими, переважно гідролітичні. Їх є багато і вони різноманітні відповідно різноманітності атакваних субстратів і середовищ. Цей клас ензимів широко застосовується у промислових технологіях. Реакції, здійснювані позаклітинно, як правило, є лімітуючими стадіями деградації полімерів. Це тому, що рослинні полімери хімічно стійкі структури, які володіють кристалічністю і малою розчинністю у воді.

З розвитком біотехнологічної промисловості відкрилися нові перспективи одержання позаклітинних ензимів та ензимних препаратів у великих обсягах. Перевага мікроорганізмів, як джерела ензимів полягає в тому, що, по-перше – для них властива велика швидкість розмноження, по-друге – для їх вирощування використовується дешева сировина і по-третє – зміною умов вирощування мікро-організмів можна регулювати синтез необхідних ензимів.

Ензимні препарати від чистих ензимів відрізняються тим, що вони крім основного ензиму містять інші ензими, а також баластні речовини.

Назва ензимного препарату складається із скороченої назви основного ензиму і назви його продуцента. Наприклад, препарат амілосубтилін ГЗх означає, що основним ензимом у ньому є амілаза, а одержують його при культивуванні *Bacillus subtilis*. Препарати, які одержують при глибокому способі культивування продуцента мають індекс «Г», а при поверхневому – «П». Індекс 3х, 10х і т.п. означають ступені очистки препарату.

Лабораторна робота

Дослід 1. Визначення амілолітичної активності ензимних препаратів

Амілолітична активність характеризує здатність амілолітичних ензимів каталізувати розщеплення крохмалю до декстринів різної молекулярної маси і виражається числом одиниць цих ензимів у грамі препарату.

За одиницю активності амілолітичних ензимів (АС) прийнято таку їх кількість, яка за певних умов: температури, рН і часу дії каталізують розщеплення до декстринів 1.0 г розчинного крохмалю, що складає 30% від його кількості, яка введена у середовище, де проходить реакція.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| 1) 1% розчин крохмалю; | 10) мірна колба на 100.0 мл – 3 шт.; |
| 2) ацетатний буфер з рН 4,7; | 11) мірна колба на 200.0 мл – 2 шт.; |
| 3) розчин ензимного препарату; | 12) бюретка на 50.0 мл; |
| 4) водяна баня; | 13) піпетка на 10 мл – 1 шт.; |
| 5) фотоелектроколометр; | 14) піпетка на 1 мл – 2 шт.; |
| 6) пробірки – 2 шт.; | 15) склянка на 100.0 мл – 1 шт.; |
| 7) штатив; | 16) 0.1N HCl; |
| 8) бюретка на 50.0 мл | 17) J; |
| 9) скляні палички; | 18) KJ. |

Приготування реактивів.

Для приготування розчину йоду спочатку готують його маточний розчин. Для цього вносять у 100 мл стакан 0,5 г J і 5.0 г KJ і розчиняють у невеликій кількості дистильованої води. Після повного розчинення переносять у мірну колбочку об'ємом 200 мл і доводять до мітки дистильованою водою. Розчин зберігають у темному місці і використовують протягом одного місяця. Для приготування робочого розчину йоду беруть 2 мл маточного розчину і переносять у мірну колбу об'ємом 200 мл і доводять до мітки 0.1N HCl.

Приготування розчину ензимного препарату проводять наступним чином. Зважують 0,1 г препарату і поміщають у стаканчик на 50.0 мл і скляною паличкою ретельно розтирають у невеликій кількості дистильованої води, кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 100 мл і перемішуючи, доводять до мітки водою. При необхідності фільтрують. Одержаний розчин (маточний) можна зберігати при +2°C до -4°C протягом 24 годин.

В день проведення аналізу з маточного розчину ензимного препарату готують робочий розчин з такого розрахунку, щоб у 5 мл його була така кількість ензиму (виходячи з активності ферментного препарату), яка б забезпечила гідроліз взятого для аналізу крохмалю від 20 до 70%.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 10 мл 1% розчину крохмалю і ставлять у водяну ванну при температурі 30°C на 5-10 хв (преінкубація). Опісля, не витягуючи пробірок з ванни, в одну наливають 5 мл дистильованої води (контрольна), а в другу – 5 мл робочого розчину ензимного препарату (дослідна), швидко перемішують та інкубують протягом 10 хвилин.

Після закінчення інкубації з кожної пробірки відбирають по 0,5 мл суміші і переносять відповідно у колбочки, в які попередньо налито по 50 мл робочого розчину йоду і ретельно перемішують. У колбочці, в яку внесено суміш із контрольної проби, розчин приймає синій колір, а в дослідній – фіолетовий, відтінок якого буде залежати від кількості непрогідролізованого крохмалю. Оптичну густину розчинів вимірюють на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 656 нм в кюветах з товщиною поглинаючого шару 1 см. Контрольним розчином при колориметруванні досліджуваних проб служить дистильована вода.

Кількість розщепленого крохмалю (С) в грамах вираховують за формулою:

$$C = (D_1 - D_2) \times 0.1 / D_1,$$

де: D_1 – оптична густина контрольної проби;

D_2 – оптична густина дослідної проби;

0,1 – маса крохмалю, яку взято для досліді, г.

У випадку, коли маса розщепленого крохмалю становить менше 0,02 г або більше 0,07 г то дослідження повторюють, беручи відповідно більшу або меншу кількість вихідного розчину ензиму.

Для визначення амілолітичної активності (АС) в од/г ензимного препарату бактерійного походження користуються формулою:

$$AC = (5.885 \times C - 0.001671) \times 1000 / n;$$

а для препаратів грибкового походження формулою:

$$AC = (7.264 \times C - 0.03766) \times 1000 / n,$$

де: С – маса розщепленого крохмалю, г;

n – маса ензимного препарату, взятого для дослідження;

1000 – коефіцієнт перерахунку міліграмів у грами;

5,885; 0,001671 – коефіцієнти, одержані при математичній обробці;

7,264; 0,03766 – коефіцієнти для перерахунку на одиницю дії ензиму.

Дослід 2. Визначення глюкоамілазної активності ензимних препаратів

Глюкоамілазна активність характеризує здатність ензимного препарату каталізувати розщеплення розчинного крохмалю до глюкози і виражається числом одиниць активності у грамі препарату.

За одиницю глюкоамілазної активності прийнято таку кількість ензиму, яка діючи на розчинний крохмаль при температурі 30°C і рН 4,7 за 1 хв звільняє 1 ммоль глюкози.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| 1) 1% розчин крохмалю; | 11) піпетка на 1 мл; |
| 2) ацетатний буфер з рН 4,7; | 12) піпетка на 5 мл – 2 шт.; |
| 3) 1М фосфатний буфер; | 13) піпетка на 10 мл – 1 шт.; |
| 4) розчин А; | 14) кип'яча водяна ванна; |
| 5) розчин Б; | 15) штатив; |
| 6) робочий розчин; | 16) лійка; |
| 7) розчин ензимного препарату; | 17) фільтрувальний папір; |
| 8) мірна колба на 1000 мл. | 18) фотоелектроколориметр; |
| 9) мірна колба на 100 мл; | 19) колбочка на 50 мл; |
| 10) ультратермостат; | 20) пробірки – 3 шт. |

Приготування реактивів.

1. Розчин А – 0.1% калій-фери-111-гексаціанід готують в день аналізу.
2. Розчин Б – (5-6 мг глюкозооксидази, що відповідає 500-600 од/г ензимної активності, розчиняють в 1 М фосфатному буферному розчині з рН 7,5 у мірній колбочці об'ємом 50 мл, а після додають 2 мг пероксидази).
3. Робочий розчин (готують шляхом змішування рівних об'ємів розчинів А і Б і зберігають в темній склянці на холоді протягом 2-3 діб).
4. Розчин ензимного препарату (8,1 г досліджуваного препарату поміщають у стаканчик об'ємом 25-50 мл, ретельно розтирають скляною паличкою з невеликим об'ємом дистильованої води, кількісно переносять у 100 мл мірну колбочку і доводять до мітки водою. Розчин фільтрують через паперовий фільтр). Його можна зберігати протягом доби при температурі від +2°C до -4°C.

Хід роботи. 5 мл досліджуваного розчину ензимного препарату, нагрітого до 30°C, додають у пробірку, в якій міститься 10 мл 1% розчину крохмалю такої ж температури і інкубують протягом 10 хв в ультра-термостаті при 30°C.

Точно через 10 хв набирають 1 мл інкубату, переносять у чисту пробірку і поміщають у кип'ячу водяну ванну на 2 хв (для інактивації ензиму), а опісля охолоджують проточною водою.

Для визначення кількості утвореної глюкози в пробірку з охолодженим інкубатом вносять 5 мл розчину 6 (робочий розчин), перемішують і залишають на 45 хв при кімнатній температурі.

Одночасно з досліджуваною пробою готують контрольну. Для цього 5 мл досліджуваного розчину ензимного препарату ставлять на 10 хв у кип'ячу водяну ванну, після чого охолоджують і додають 10 мл 1% розчину крохмалю. Всі інші операції проводять так само як з дослідною пробою.

Крім цього ставлять контрольну пробу на робочий розчин: у пробірку, яка містить 3 мл робочого розчину, додають 1 мл дистильованої води, перемішують.

Інтенсивність забарвлення визначають на фотоелектроколориметрі – 60, при довжині хвилі 390 нм і 418 нм, використовуючи кювету з товщиною шару поглинання світла 10 мм.

Кількість глюкози, яка утворюється в процесі ензимної реакції, визначають по калібрувальній кривій.

Глюкоамілазну активність (ГлС) препарату од/г вираховують за формулою:

$$\text{ГлС} = \frac{a}{b} \times 100 \times 10,$$

де: а – маса глюкози в 1 мл інкубату, яка утворилася внаслідок дії ензиму, мкг;

б – кількість ферменту в 1 мл інкубату, г;

10 – тривалість інкубації, хв;

100 – молекулярна маса глюкози (перерахунок мікрограмів у мікро-молі).

Дослід 3. Визначення протеолітичної активності ензимних препаратів

Протеолітична активність (ПС) характеризує здатність ензимів розщеплювати протеїни до пептидів і амінокислот і виражається числом одиниць протеїназ в 1 г препарату.

За одиницю протеолітичної активності приймають таку масу ензиму, яка за 1 хв при 30°C перетворює таку масу субстрату в продукт, який не осаджується трихлороцтовою кислотою, що відповідає 1 мкмоллю тирозину.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1) 0.1М універсальний буферний розчин; | 11) мірна колба на 100 мл – 2 шт.; |
| 2) 1N HCl; | 12) піпетка на 1.0 мл – 4 шт.; |
| 3) 0.5 M Na ₂ CO ₃ ; | 13) піпетка на 2.0 мл – 2 шт.; |
| 4) 1N NaOH | 14) пробірки на 15 мл – 4 шт.; |
| 5) 5% ТХО; | 15) піпетка на 5.0 мл – 2 шт.; |
| 6) реактив Фоліна; | 16) лійка; |
| 7) розчин ензимного препарату; | 17) фільтрувальний папір; |
| 8) 2% розчин казеїну; | 18) фотоелектроколориметр; |
| 9) торзійна вага; | 19) скляночка на 50.0 мл – 1 шт.; |
| 10) водяна ванна; | 20) скляні палички. |

Визначають активність різних протеїназ, зокрема: кислих при значеннях рН 2,5 і 5,5; нейтральних – рН 7,2; лужних – рН 9,5.

Варіанти приготування розчину ензимного препарату для визначення активності різних протеїназ

А. кислих протеїназ (рН 2,5) – 1 г досліджуваного препарату ретельно розтирають у стаканчику скляною паличкою з невеликою кількістю 0,1 М універсального буферного розчину рН 2,5. Після цього кількісно переносять у мірну колбочку об'ємом 100 мл і доводять до мітки цим же буферним розчином;

Б. кислих протеїназ (рН 5,5) – аналогічним способом як у пункті А, лише для розчинення препарату використовують буферний розчин з рН 5,5;

В. нейтральних протеїназ – аналогічним способом як у пункті А, лише для розчинення препарату використовують буферний розчин з рН 7,2;

Г. лужних протеїназ – аналогічним способом як у пункті А, лише для розчинення препарату використовують універсальний буферний розчин з рН 9,5.

**Приготування розчину казеїнату натрію (субстрат)
для визначення активності різних протеїназ.**

А) кислих протеїназ (рН 2,5) – 2 г казеїнату натрію розчиняють у 50 мл 0,1 М універсального буферного розчину з рН 5,5 і, додаючи 3-3,5 мл 1N HCl доводять до рН 2,5.

При підкисленні цього розчину хлоридною кислотою нижче рН 5,1 спостерігається помутніння, а при рН 4,5 казеїн випадає у вигляді пластівців, які при підкисленні до рН 3,1-3,2 поступово розчиняється, а при рН 3,05-3,0 розчин стає однорідним і не змінюється при дальшому підкисленні до рН 2,5.

Після цього розчин переносять у мірну колбочку об'ємом 100 мл і доводять до мітки 0,1М універсальним буферним розчином з рН 2,5.

Додавання хлоридної кислоти (до рН 3,0) необхідно проводити швидко та інтенсивно перемішувати. При дальшому підкисленні розчину до рН 2,5 кислоти вносять по каплях.

Б) кислих протеїназ (рН 5,5) – 2 г казеїнату натрію розчиняють у 90 мл 0,1М універсального буферного розчину з рН 5,5 і доводять до рН 5,5 додаючи декілька крапель 1N HCl. Після цього розчин переносять в мірну колбочку об'ємом 100 мл і доводять до мітки 0,1 М універсальним буферним розчином з рН 5,5;

В) нейтральних протеїназ (рН 7,2) – 2 г казеїнату натрію розчиняють у 90 мл 0,1М універсального буферного розчину з рН 7,2. Якщо рН цього розчину нижче 7,2, то додають по каплях 1N NaOH до одержання рН 7,2. Розчин переносять у мірну колбочку об'ємом 100 мл і доводять до мітки цим же буферним розчином;

Г) лужних протеїназ (рН 9,5) – приготовляють аналогічним способом як для нейтральних протеїназ лише з цією різницею, що для розчинення казеїну використовують універсальний буферний розчин з рН 9,5.

Для кращого розчинення казеїнату натрію його розчиняють при нагріванні до 70°C на магнітній мішалці. Цей розчин зберігають у холодильнику не більше двох діб.

Хід роботи. В одну пробірку (дослідну) вносять 2 мл субстрату і ставлять у водяну ванну при 30°C на 10 хв (преінкубація). Після цього додають 2 мл розчину ензиму, струшують та інкубують протягом 10 хв. Точно через 10 хв у пробірку додають 4 мл 5% ТХО, швидко перемішують і залишають на 20 хв для осадження. По закінченню осадження фільтрують через паперовий фільтр у суху пробірку.

В другу пробірку (контрольну) вносять 2 мл розчину ензиму, 4 мл 5% ТХО, перемішують і ставлять у водяну ванну при 30°C на 10 хв. Після цього додають 2 мл субстрату і інкубують 20 хв. Через 20 хв знімають з ванни і фільтрують через паперовий фільтр у суху пробірку.

Далі, в одну пробірку відбирають 1 мл фільтрату дослідної проби, а в другу – 1 мл фільтрату контрольної проби і в кожную з них, перемішуючи, додають по 5 мл 0.5 М Na_2CO_3 і по 1 мл реактиву Фоліна. Проби залишають на 20 хв для проявлення. Вони приймають голубе забарвлення, інтенсивність якого визначають на фотоелектроколориметрі проти контрольної проби при довжині хвилі 656-670 нм в кюветах з товщиною поглинання світла 10 мм.

Кількість тирозину, яка утворилася в процесі ензимної реакції, визначають по калібрувальній кривій.

Протеолітичну активність (ПС) ензимного препарату в од/г вираховують за формулою:

$$\text{ПС} = A \times 4 \, 1000 / \text{ТЕ} \times 10 \times m,$$

де: А – показник екстинції фотоелектроколориметра, який відповідає кількості утвореного тирозину;

4 – відношення об'ємів реакційної суміші і розчину ензиму після додавання трихлороцтової кислоти;

ТЕ – тирозиновий еквівалент (по калібрувальній кривій);

10 – час інкубації, хв;

m – маса ензимного препарату у пробі (мг на 1 мл розчину ензиму);

1000 – коефіцієнт для переведення на 1 г ензимного препарату.

Дослід 4. Визначення пектолiтичної активностi ензимних препаратiв

Пектолiтична активнiсть (ПкС) характеризує здатнiсть ензимiв розщеплювати пектин. За одиницю пектолiтичної активностi по цьому методу прийнята така маса ензиму, яка за вiдповiдних умов температури, рН i часу дiї каталiзує гiдролiз 1г пектину до продуктiв, що не осаджуються сiрчаноокислим цинком. Масу продуктiв гiдролiзу пектину вимiрюють на iнтерферометрi УТР-2.

Матерiали, обладнання та реактиви:

- | | |
|--------------------------------|----------------------------|
| 1) 15% ZnSO ₄ ; | 8) торзiйна вага; |
| 2) конц. розчин амiаку; | 9) водяна ванна; |
| 3) 1% розчин пектину; | 10) марля; |
| 4) розчин ензимного препарату; | 11) лiйка – 2 шт.; |
| 5) пiпетка на 2.0 мл – 2 шт.; | 12) мiрна колба на 250 мл; |
| 6) пiпетка на 10.0 мл- 2 шт.; | 13) паперовий фiльтр. |
| 7) iнтерферометр УТР-2; | |

Приготування розчину пектину. Зважують 2,5 г пектину i всипають при постiйному перемiшуваннi у конiчну колбу, в яку попередньо вiдмiряли бiля 130 мл дистильованої води. Перемiшують протягом 10 хв i залишають на 3 години при кiмнатнiй температурi. Пiсля цього додають, постiйно перемiшуючи, концентрований розчин амiаку до встановлення рН 4,0 i дистильованою водою доводять до об'єму 250 мл, ретельно перемiшують i фiльтрують через два шари марлi. Розчин пектину готують за 2-3 години до проведення аналізу. Його забарвлення повинно бути свiтло-сiрим. Розчин можна використовувати протягом чотирьох дiб за умов зберiгання його в холодильнику.

В пробiрку (дослiдну) наливають 20 мл субстрату i ставлять у термостатуючу водяну ванну при температурi 30°C на 10 хв. Пiсля цього, не виймаючи з ванни, в пробiрку додають 10 мл розчину ензимного препарату, ретельно перемiшують i продовжують iнкубувати протягом 1 години. По закінченнi iнкубацiї виймають iз ванни, додають 2 мл 15% ZnSO₄, ретельно перемiшують i фiльтрують через паперовий фiльтр. Якщо фiльтрат мутний, то фiльтрування повторюють через цей же фiльтр до одержання прозорого розчину.

В другу пробірку (контрольну) наливають 2 мл 15% ZnSO_4 , 10 мл розчину досліджуваного ензиму і 20 мл розчину субстрату. Вміст пробірки ретельно перемішують протягом 2-3 хв і фільтрують.

Потім фільтрат дослідної проби наливають у ліве відділення кювети інтерферометра з довжиною грані 40 мм, а фільтрат контрольної проби – в праве відділення і вимірюють величину зміщення інтерференційних смуг, яке виникає внаслідок неоднакових показників заломлення контрольного і дослідного розчинів.

Для забезпечення точності досліді необхідно підібрати таке розведення розчину ферментного препарату, щоб показник інтерферометра знаходився в межах від 400 до 1250.

Дослід 5. Визначення целюлозолітичної активності ензимних препаратів

Метод ґрунтується на визначенні маси редукуючих речовин (цукрів), які утворюються внаслідок дії целюлозолітичних ензимів на целюлозу. За одиницю активності приймається така кількість ензиму, яка діючи на целюлозу протягом години утворює 1 мг редукуючих речовин.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| 1) 0.1N ацетатний буфер рН 4,7; | 8) мірна колба на 1000 мл; |
| 2) Na_2CO_3 ; | 9) мірна колба на 100 мл; |
| 3) хроматографічний папір; | 10) склянка на 50 мл; |
| 4) розчин ензиму; | 11) скляна паличка; |
| 5) фотоелектроколориметр; | 12) мірна колба на 500 мл; |
| 6) 0,06% калій- феро-111-гексаціанід; | 13) піпетка на 1 мл – 4 шт. |
| 7) водяна ванна; | |

Приготування реактивів.

1. 0,06% калій- феро-111-гексаціанід (6 г Na_2CO_3 розчиняють у 200 мл дистильованої води і переносять у мірну колбу на 1.0 л. Після цього в колбу додають 0,6 г калій- феро-111-гексаціаніду розчиняють і доводять до мітки. В темній склянці розчин можна зберігати до двох місяців).

2. Розчин препарату ензиму (0,1-1,0 г ензимного препарату відважують у хімічний стакан і ретельно розтирають скляною паличкою у невеликому об'ємі дистильованої води і кількісно переносять у мірну колбочку на 100 мл. Доводять дистильованою водою до мітки і перемішують.

3. Приготування розчину глюкози для побудови калібрувальної кривої (75 мг безводного порошку глюкози розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі об'ємом 500 мл (робочий розчин). 1 мл цього розчину містить 15 мкг глюкози. Для побудови калібрувальної кривої готують серію розведень:

Пор. №	Взято робочого розчину, мл	Додано дистильованої води, мл	Кількість глюкози, мкг
1.	0,1	0,9	15
2.	0,3	0,7	45
3.	0,5	0,5	75
4.	0,7	0,3	105
5.	0,9	0,1	135
6.	1,0	-	150

Хід роботи. Смужку хроматографічного паперу розміром 1×6 см і масою 49-51 мг, складену в гармошку, поміщають в пробірку і заливають 1 мл ацетатного буферу, ставлять у водяну ванну при температурі 50°C на 10 хв. Додають 1 мл розчину ензимного препарату і інкубують протягом 60 хв. Після цього надбирають 1 мл інкубату і переносять в другу пробірку, додають 3 мл 0,06% калію-феро-111-гексаціаніду перемішують і кип'ятять у водяній ванні протягом 10 хв. Після цього вміст пробірки охолоджують і фотометрують на ФЕКу на синьому світло-фільтрі (390-420 нм) у кюветах з товщиною поглинаючого шару 10 мм. Колориметрування проводять проти дистильованої води.

Одночасно з дослідною пробою готують контрольну. Для цього в пробірку вносять 1 мл ацетатного буферу і 1 мл ензимного препарату, перемішують. Відбирають 1 мл суміші, яку переносять в другу пробірку і додають 3 мл 0,06% розчину заліzosинеродистого калію, кип'ятять 10 хв і колориметрують, так як і дослідну пробу. Кількість глюкози визначають по калібрувальній кривій.

Целюлозолітичну активність препарату вираховують за формулою:

$$C = a / n \times t \times 1000 \text{ од/г,}$$

де: а – маса глюкози (мкг), яку знаходять по калібрувальній кривій;

n – кількість ензимного препарату в 1 мл інкубату, г;

t – тривалість інкубації, год;

1000 – перерахунок глюкози з мкг в мг.

Список використаної літератури

1. Біоорганічна хімія : практикум. Остапченко Л. І. та ін. Київ, 2020. 410 с.
2. ГОСТ-2024.2-81. Метод визначення протеолітичної активності.
3. ГОСТ-2024.3-81. Метод визначення пектолітичної активності.
4. ГОСТ-2024.3-81. Метод визначення амілазної і глюкоамілазної активності.
5. Методи визначення активності ферментних препаратів і норми згодовування їх тваринам : методичні рекомендації. Довгань Н. Я. та ін. Львів, 1987. 24 с.
6. Хімія білка : підручник. Сибірня Н. О. та ін. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2010. 393 с.
7. Barker S. B. and Summerson W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *Journal of Biological Chemistry*. 1941. № 138. 535-554.
8. Friedemann Th. E. and Haugen G. E. The determination of keto acids in blood and urine. *Journal of Biological Chemistry*. 1943. № 147. 415-442.