МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ ТА ФАРМАЦІЇ
КАФЕДРА ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ

БІОТЕХНОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних робіт студентів факультету хімії та фармації
першого (бакалаврського) рівня освіти
спеціальності 102 «Хімія», ОПП «Фармацевтична хімія»

ОДЕСА
ОНУ
2023

УДК 60(076)
Б63

Укладачі:
О. І. Грицук, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакології та технології ліків;
А. О. Цісак, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків.

Рецензенти:
Л. В. Еберле, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова;
О. І. Александрова, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова.

Рекомендовано вченою радою факультету хімії та фармації ОНУ імені І. І. Мечникова. Протокол № 8 від 12 травня 2023 р.

Біотехнологія [Електронний ресурс] : електрон. метод. вказівки до лаб. робіт студ. факультету хімії та фармації першого (бакалаврського), спец. 102 «Хімія», ОПП «Фармацевтична хімія» / уклад.: О. І. Грицук, А. О. Цісак, – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2023. – 33 с. – 0,8 МБ.

Б63

Пропоновані методичні вказівки стануть у нагоді при виконанні лабораторних робіт з дисципліни вільного вибору «Біотехнологія», яка викладається студентам першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 102 «Хімія» факультету хімії та фармації Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

УДК 60(076)

© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2023

ЗМІСТ

Лабораторна робота 1
Методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів
та основні прийоми їх мікроскопування.
Забарвлення бактерій за Грамом …… 4

Лабораторна робота 2
Види бродіння. Молочнокисле бродіння …….. 10

Лабораторна робота 3
Спиртове бродіння …….. 15

Іммобілізація ферментів та клітин мікроорганізмів …… 17

Лабораторна робота 4
Іммобілізація клітин дріжджів ……... 20

Лабораторна робота 5
Включення α-амілази до гелю альгінату кальцію.
Отримання лікувального покриття для ран та опіків
на основі протеолітичних ферментів ……. 22

Лабораторна робота 6
Визначення амілолітичної та протеолітичної активності
нативних та іммобілізованих ферментів ……... 24

Лабораторна робота 7
Одержання біосенсора для напівкількісного визначення
білка в сечі …… 27

Лабораторна робота 8
Хемілюмінесценція біологічних об'єктів …….. 29

Рекомендована література …….. 32

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1

Методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів та основні прийоми їх мікроскопування. Забарвлення бактерій за Грамом

Мета: знайомство з методами мікроскопічного дослідження мікроорганізмів та основними прийомами мікроскопування.

Матеріали та обладнання: покривне скло, скло з поглибленнями, предметне скло, спиртівки, бензин, препарувальні голки, стерильні піпетки, дистильована вода, фільтрувальний папір, марля, мікроскопи, лампи для освітлення; настої: гороху, сінної палички, суспензія дріжджів; барвники: фуксин основний, метиленовий синій, розчин Люголя, генціанвіолет.

Хід роботи:

1. Ознайомитись із правилами роботи в лабораторії.
2. Дізнатися про методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів.
3. Ознайомитись із правилами роботи з мікроскопом.
4. Розглянути техніку приготування живих та фіксованих препаратів мікроорганізмів:
   а) приготувати живі препарати даних настоїв та суспензій двома способами (підфарбувати фуксином або метиленовим синім);
   б) приготувати фіксовані препарати мікроорганізмів із наявних суспензій та зубного нальоту (забарвлення фуксином);
   в) забарвити мікроорганізми за Грамом;
   г) розглянути всі приготовані живі та фіксовані препарати мікроорганізмів, використовуючи імерсійний об'єктив;
   д) відзначити грам (+) та грам (-) бактерії в культурах, замалювати.

Основні відомості про методи світлової мікроскопії

За допомогою сучасного біологічного мікроскопа можна отримати збільшення у 2500 разів і провести ідентифікацію об'єкта, розглянувши його морфологічні особливості. Сучасний світловий мікроскоп дозволяє розглянути об'єкти завбільшки щонайменше 0,2–0,3 мкм. Оскільки живі мікроорганізми прозорі і погано видні у світлі, то для детального вивчення зазвичай використовують фіксовані і пофарбовані бактерії. Можна використовувати також препарати живих бактерій, до краплі суспензії яких доданий певний барвник.

Додаткові прийоми, застосовувані для вивчення мікроорганізмів, дозволяють виділити ряд методів для їх дослідження.

Робота з імерсійним об'єктивом

Об'єктиви мікроскопа поділяються на сухі та імерсійні (масляно-занурені). Сухі об'єктиви (х8, х9, х10, х20, х40) застосовують при невеликих збільшеннях (до 500 разів). Між об'єктивом та препаратом знаходиться шар повітря. Тому через відмінність у показниках заломлення скла, повітря і препарату частина світлових променів відхиляється і потрапляє у око спостерігача. Для дослідження мікроорганізмів використовують імерсійні об'єктиви (х90), що дають збільшення від 600 до 1350 разів, залежно від збільшення окуляра, що використовується (7х, 8х, 9х, 10х, 15х.)

При роботі з імерсійним об'єктивом його занурюють у краплю кедрової або ялицевої олії, нанесеної на препарат. Показник заломлення цієї олії близький до показника заломлення скла, і між склом та лінзою об'єктива встановлюється однорідне середовище. Завдяки цьому всі промені, не заломлюючись і не змінюючи свого напрямку, потрапляють в об'єктив і забезпечують хорошу видимість мікроорганізмів.

Імерсійним об'єктивом користуються наступним чином. Приготовлений прижиттєвий або фіксований препарат бактерій спочатку розглядають за допомогою об'єктиву сухої системи (х10, х20, х30, х40), знайшовши найцікавіше місце на ньому. Препарат закріплюють на

столику затискачами, в центр його (на покривне скло або на предметне у разі фіксованого препарату) наносять краплю імерсійної олії та замінюють сухий об'єктив на імерсійний (х90). Зазвичай цей об'єктив відзначений зовні по периметру чорною смугою та має рухому закріплену лінзу. Об'єктив повинен зануритися лінзою в краплю олії, але не торкатися впритул препарату, щоб не вийшло пошкодження. Фокус уточнюють за допомогою мікрогвинта, який використовують для детального вивчення препарату. При цьому слід збільшити освітлення, відкривши діафрагму конденсора.

Для використання повної сили імерсійного об'єктиву краплю імерсійного масла наносять і на поверхню верхньої лінзи конденсора, опущеного вниз, що роблять при темнопольній мікроскопії. Потім конденсор піднімають до зіткнення олії з нижньою поверхнею предметного скла препарату. Після роботи кедрову олію негайно видаляють з об'єктиву та препарату. Олію спочатку знімають фільтрувальним папером, а потім ганчірочкою, змоченою в бензині. КСИЛОЛ ТА СПИРТ НЕ ВИКОРИСТОВУВАТИ! ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ ВЕДЕ ДО РОЗКЛЕЮВАННЯ лінз!

Основні прийоми мікроскопування мікроорганізмів

Приготування живих препаратів мікроорганізмів

I. Метод розчавленої краплі

У центр предметного скла наносять піпеткою досліджуваний матеріал – краплю суспензії з мікроорганізмами. Якщо завись густа, потрібно попередньо розбавити її дистильованою водою. Покривне скло ставлять на ребро біля краю краплі і поступово опускають на неї таким чином, щоб між склом не залишалося бульбашок повітря. Крапля має бути невеликою, щоб після роздавлювання рідина не виступала за краї покривного скла, надлишки рідини слід прибрати фільтрувальним папером. Препарат через висихання не може довго зберігатись. Вивчають

препарат у світлому та темному полі, використовуючи імерсійний об'єктив.

II. Метод висячої краплі

На чисте покривне скло нанести краплю суспензії мікробів, накласти на нього предметне скло з поглибленням, притискаючи щільно, перевернути їх. Крапля має висіти на покривному склі над поглибленням предметного скла, тобто у закритій камері. Висячу краплю розглядають, користуючись дзеркалом, діафрагму звужують при цьому при малому і розширюють при великому збільшенні. Метод дає можливість спостерігати мікроорганізми тривалий час і стежити за поділом клітин.

При роботі з живими препаратами мікроорганізмів для кращого бачення краплю суспензії можна трохи підфарбувати розчином нейтрального червоного, а за відсутності його слабким розчином йоду, метиленовим синім або фуксином. Невеликі концентрації барвників не впливають на життєдіяльність клітин, що зберігають свою рухливість.

Приготування фіксованих препаратів мікроорганізмів

Для детальнішого вивчення мікробів застосовують фіксовані препарати. Цей процес складається з наступних операцій: приготування мазка, висушування препарату, його фіксація та фарбування.

Техніка приготування мазка

1. На центр чистого предметного скла нанести краплю суспензії мікроорганізмів (якщо завись надто густа, необхідно розбавити дистильованою водою).
2. Тією ж піпеткою рівномірно, дуже тонким шаром розподілити суспензію на 1/3 центральної частини поверхні предметного скла.
3. Дати мазку висохнути (на повітрі, під лампою або високо над полум'ям пальника).
4. Зафіксувати мазок сухим жаром: закріпивши предметне скло тримачем мазком нагору, проводять його крізь полум'я спиртовки

плавними круговими рухами три-п'ять разів. При цьому мікроорганізми вбиваються та міцно прикріплюються до скла.

5. Після охолодження на скляному штативі пофарбувати мазок: наносять піпеткою на поле мазка барвник на одну-дві хвилини або більше згідно з методом фарбування.

6. Після цього фарбу з мазка змивають на штативі струменем води, надлишки води з нижньої поверхні скла знімають фільтрувальним папером. Мазок підсушують під лампою – готовий до розгляду за допомогою імерсії.

Примітка: при роботі з фіксованими препаратами мікробів кедрову олію наносять безпосередньо на ПРЕДМЕТНЕ СКЛО, оскільки бактерії міцно закріплені на ньому.

Забарвлення бактерій за Грамом. Цей спосіб дозволяє диференціювати подібні за формою та розмірами мікроорганізми, що належать до різних видів. Метод заснований на здатності деяких форм бактерій утворювати в клітині міцне з'єднання основних барвників – генціанвіолету та йоду, яке не знебарвлюється при подальшій обробці спиртом, внаслідок чого ці бактерії зберігають синьо-фіолетове забарвлення та називаються грампозитивними – грам (+). Інші бактерії не мають властивість утримувати забарвлення і при роботі спиртом знебарвлюються. Це грамнегативні бактерії – грам (–). Відношення до фарбування за Грамом служить однією з основних ознак бактерії в її характеристиці.

Здатність бактеріальних клітин фарбуватися за Грамом залежить головним чином від хімічного складу та структури клітинних стінок. У грам (+) бактерій клітинна стінка на 95 % складається з муреїну (пептидоглікану) та тейхоєвої кислоти. До складу клітинної стінки грам (–) бактерій входять ліпопротеїди, ліпополісахариди, фосфоліпіди, незначна кількість (5 %) муреїну.

Забарвлення за Грамом пов'язане також з віковими особливостями культури: краще фарбуються бактерії в молодих дво-, триденних культурах.

Техніка фарбування бактерій за Грамом

1. Приготувати фіксований мазок досліджуваної культури мікроорганізмів.
2. Мазок пофарбувати генціанвіолетом на 1–2 хвилини на штативі.
3. Не змиваючи барвник, витісняємо його розчином Люголя, також залишаємо на 1–2 хв.
4. Промити препарат водою.
5. Обробити препарат 95 % спиртом або ацетоном: одну-дві краплі реактиву наносять на поле мазка на 1–2 хв.
6. Змити реактив водою.
7. Провести фарбування препарату фуксином на 1–2 хв., промити водою, підсушити, розглянути з імерсією. Грам (+) мікроорганізми при цьому забарвлюються в бузково-фіолетовий колір, грам (-) – у рожево-малиновий.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2

Види бродіння
Молочнокисле бродіння

Мета: познайомитись з хімізмом молочнокислого бродіння, з якісними реакціями на молочну кислоту, з морфологією молочнокислих бактерій.

Матеріали та обладнання: свіже і кисле молоко, розсоли капусти, огірків, 0,1 н р-н $NaOH$, 10 % розчин сірчаної кислоти, насичений р-н $CuSO_4$, 2 % р-н $KMnO_4$, 0,5 % аміачний р-н $AgNO_3$, спиртовий 5 % р-н фенолу, 5 % р-н $FeCl_3$, р-н фенолфталеїну, водний р-н метиленового синього, рідина Нікіфорова, р-н генціанвіолета, р-н Люголя, 96 % спирт, р-н карболового фуксину, дистильована вода, колби на 50 мл, піпетки на 10 мл, фільтрувальний папір, вата, предметні стекла, спиртівки, мікроскопи, настільні лампи, скляні штативи з кристалізаторами, промивалки.

Хід роботи

1. Зробити якісні реакції на молочну кислоту, записати рівняння реакцій.
2. Визначити кислотність молока, обчислити кількість молочної кислоти у 100 мл молока та збільшення кислотності у міру скисання молока.
3. Ознайомитись із морфологією молочнокислих бактерій. Приготувати препарати, пофарбувати метиленовим синім за Грамом, розглянути з імерсією, замалювати.

Бродіння – еволюційно найдавніший і примітивний спосіб отримання енергії, характерний для низки груп прокаріотів. Основні типи бродіння – спиртове, молочнокисле і маслянокисле – відкриті

Л. Пастером (1860-і роки), хоча продукти бродіння були відомі людині з незапам'ятних часів.

Хімізм молочнокислого бродіння

Молочнокисле бродіння викликається молочнокислими бактеріями, які за допомогою ферментів зброджують молочний цукор (лактозу) та будь-який інший цукор (глюкозу) до молочної кислоти та інших продуктів:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + E \text{ (АТФ)}.$$

Процес йде із накопиченням енергії у вигляді АТФ. За характером бродіння молочнокислі бактерії поділяються на дві групи: гомоферментативні, коли продукт розкладання – молочна кислота, та гетероферментативні, що викликають утворення, крім молочної кислоти, інших продуктів бродіння: спирту, оцтової кислоти, CO_2 та ін.

До першої групи належать: молочнокислий та вершковий стрептококи, ацидофільна та болгарська палички.

Представники гомоферментативного бродіння

Молочнокислий стрептокок (*Streptococcus lactis*)

Має вигляд овальних коків діаметром 0,5–1 мкм, що розташовуються в культурі попарно. Це диплококи, а короткі ланцюжки – стрептококи. Мікроорганізми грам (+), – оптимальна температура розвитку – 30–35 °С. Зброджують молочний цукор (лактозу), а також мальтозу. Молоко згортається через 10–12 годин.

Вершковий стрептокок (*Streptococcus cremoris*)

Зустрічається в молочнокислих продуктах з великою жирністю, має вигляд довших ланцюжків. Використовується для виробництва олії, сирів та сметани.

Болгарська паличка (*Lactobacterium bulgaricum*)

Нерухома, грам(+), розташовується у вигляді окремих клітин та коротких ланцюжків. Оптимальна температура її розвитку – 40–45 °С.

Ацидофільна паличка (*Lactobacterium acidophilum*)

За морфологією близька до болгарської палички, але має інший температурний оптимум розвитку – 37 °С. Використовується для виготовлення ацидофіліну.

Огіркова паличка (*Lactobacterium cucumeris*)

Коротка, грам(+) бактерія, нерухома. Розвивається в розсолі засолених огірків, капусти, у силосі.

До другої групи – гетероферментативних бактерій – належать капустяна паличка, ряд лактобацил (*Lactobacillus plantarum*, *L. fermenti*, *L. brevis*), а також кефірні дріжджі та молочна пліснява. Мікроорганізми цієї групи частіше зустрічаються в заквашених овочах та силосі. Молочнокислі бактерії поширені у природі. Вони завжди є в грунті, на поверхні рослин, що є джерелом їхньої постійної появи в молочних та інших продуктах. У промисловості використовують культурні раси бактерій, які мають низку переваг перед дикими формами.

Представники гетероферментативного бродіння

Капустяна паличка (*Lactobacterium brassicae*)

Разом з огірковою зустрічається в заквашених овочах, грам(+), зчеплена в пари та ланцюжки. Оптимум розвитку – 25 °С. У молочнокислих продуктах можна зустріти і пропіонових бактерій, що потрапляють у молоко з ґрунту та рослин. Їм належить значна роль при дозріванні сичужних сирів.

Кефірні дріжджі (*Saccharomyces kefiri*),

Переводять молочний цукор (лактозу) в спирт, невелика кількість якого виробляється цими організмами.

Молочна пліснява (*Oidium lactis*)

Можна виявити зверху на молочнокислих продуктах, що має міцелій, що розпадається на чотирикутні або овальні клітини, що відрізняються порівняно великими розмірами. Окислює молочну кислоту до CO_2 та води, погіршуючи якість скислого молока.

Якісні реакції на молочну кислоту

1. Визначення оцтового альдегіду

Кисле молоко фільтрують через складчастий фільтр, до 10 мл фільтрату додають 1 мл 10 % розчину сірчаної кислоти, нагрівають у конічній колбі до кипіння, потім по краплях додають 2 % розчин (2 мл) $KMnO_4$. У цих умовах відбувається окислення молочної кислоти $KMnO_4$ до CH_3COH (оцтовий альдегід):

а) $2KMnO_4 + 3H_2SO_4 = K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 3H_2O + 3O_2$.

Потім покривають шийку колби фільтрувальним папером, змоченим аміачним розчином оксиду срібла (спочатку змочують папір 0,5 % розчином $AgNO_3$, потім розчином NH_4OH). Папір темніє під впливом парів оцтового альдегіду:

$$CH_3CHOHCOOH + 5(O) = 5CH_3COH + 5CO_2 + 5H_2O$$

б) $CH_3COH + 2[Ag(NH_3)_2]OH + 3H_2O = CH_3COOH + 2Ag + 4NH_4OH$.

2. Реакція Уффельмана (проба з фенолом)

У пробірку до 10 мл 5 % розчину фенолу додати кілька крапель 5 % розчину хлорного заліза ($FeCl_3$). Спостерігаємо утворення інтенсивно забарвленого синього розчину. Додавання однієї-двох крапель сироватки кислого молока, що містить молочну кислоту, робить розчин жовтуватим.

Визначення кислотності молока

У широкодонну колбу об'ємом 150 мл наливають 40 мл свіжого молока, закривають ватною пробкою і поміщають у термостат при температурі 30–35 °С до наступного заняття. В іншій порції молока визначають його вихідну кислотність. Для цього в конічну колбу на 50 мл наливають 10 мл молока, додають 20 мл дистильованої води та дві-три краплі фенолфталеїну. Суміш ретельно збовтують і титрують 0,1 н розчином їдкого натру до слаборожевого забарвлення індикатора. Розраховують кислотність у градусах Тернера. Градус Тернера (°Т) –

умовна величина, що дорівнює кількості мілілітрів 0,1 н р-ну лугу, витраченого на нейтралізацію 100 мл молока.

Приклад розрахунку: на титрування 10 мл молока пішло 5 мл 0,1 н розчину лугу; розрахуємо кількість лугу, витрачену на титрування 100 мл молока:

5 мл лугу – 10 мл молока;

х мл лугу – 100 мл молока.

Кислотність у градусах Тернера складе:

$$X = \frac{5 \times 100}{10} = 50\ °T.$$

Кислотність парного молока коливається від 10 до 25 °Т. Гранична кислотність молока коливається від 110 до 115 °Т.

Приготування препаратів із молочнокислих продуктів

Нанести одну краплю будь-якого молочного продукту на предметне скло, розбавити краплею дистильованої води і зробити тонкий мазок, трохи підсушити на повітрі, а потім зафіксувати з одночасним знежиренням сумішшю Нікіфорова (не менше 10 хв). Забарвлення роблять протягом 3–5 хв водним розчином метиленового синього, промивають водою, висушують та мікроскопують із застосуванням імерсійного мікроскопа.

Мікрофлору розсолів капусти та огірків препарують звичайним способом, без знежирення сумішшю Нікіфорова. Забарвлення мазка роблять метиленовим синім або карболовим фуксином 3–5 хв.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3

Спиртове бродіння

Мета: познайомитися з хімізмом та якісними реакціями спиртового бродіння, з морфологією збудників цього виду бродіння.

Матеріали та обладнання: дріжджі пекарські, 10 % р-р сахарози, 10 % р-р їдкого натру, йод кристалічний, $Ba(OH)_2$ або $Ca(OH)_2$, спиртівки або плитки, колба на 200-250 мл, пробка з газовідвідною трубкою, штатив, $K_2Cr_2O_7$ кристалічний.

За годину до заняття настояти в колбі дріжджі, 50 мл 10 % р-ну сахарози і близько 1 г дріжджів.

Хід роботи

1. Познайомитись з хімізмом та морфологією мікроорганізмів, приготувати препарати, пофарбувати, замалювати.
2. Виконати якісні реакції, записати рівняння реакцій.
3. Провести вимірювання розмірів клітин дріжджів.

Хімізм та представники спиртового бродіння

Збудники спиртового бродіння поширені у природі – дикі дріжджі. До них відносяться дріжджові гриби роду *Mycoderma* і *Torula*, плісняві гриби роду *Mucor* і деякі бактерії. Культурні дріжджі виведені шляхом тривалої селекції диких дріжджів. До них відносяться: *Saccharomyces cerevisiae* і *S. vini, S. ellipsoides*. Ці дріжджі відрізняються від диких тим, що здатні витримувати великі концентрації спирту в середовищі, утворюють менше побічних продуктів бродіння, внаслідок чого інтенсивніше йдуть процеси бродіння. Спиртове бродіння йде в анаеробних умовах, тоді як розмноження дріжджів відбувається за широкого доступу кисню за оптимальних температур 30–35 °С. Спирт, що утворюється, шкідливий для дріжджів, і при його накопиченні бродіння припиняється. Однак при високій концентрації цукру в розчині

дріжджі можуть залишатися живими в середовищі, що містить до 15 % спирту. Сумарно процес бродіння виражається наступним рівнянням:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + CO_2 \uparrow + 130 \text{ кДж (31 ккал)}$$

Якісні реакції на бродіння

1. Реакція із кристалічним йодом

До 10 мл рідини, що бродить, в пробірку додати 1–2 мл концентрованого розчину 10 % лугу і підігріти на спиртовці, не доводячи до кипіння (60 °С). Потім додають кілька кристаликів йоду та знову нагрівають. У присутності спирту випадає жовтий осад йодоформу, що має характерний запах:

$$C_2H_5OH + 4J_2 + 6NaOH = CHJ_3 + HCOONa + 5NaJ + 5H_2O$$

$$C_2H_5OH + 4J_2 = CJ_3CHOHJ + 4HJ$$

$$CJ_3CHOHJ = CJ_3COH + HJ$$

$$CJ_3COH + NaOH = HCOONa + CHJ_3$$

2. Виявлення вуглекислого газу

У колбу ємністю 250 мл наливають 50 мл 10 % розчину сахарози і близько 1 г пекарських дріжджів, попередньо розведених в 10 мл 10 % сахарози. Колбу закривають пробкою із зігнутою трубкою, нижній кінець якої занурюють у пробірку з баритом або вапняною водою. Колбу з рідиною, що бродить, поміщають у водяну баню на плитці, де підтримується температура 35–40 °С з періодичним підігрівом. Через кілька хвилин після установки в пробірку з баритом починають надходити бульбашки газу, згодом струм стає рівномірним. Баритова вода починає інтенсивно каламутніти. Стежать за виділенням пляшечок і помутнінням рідини.

Іммобілізація ферментів та клітин мікроорганізмів

Іммобілізація – це процес прикріплення біологічних агентів (ферментів, клітин) до поверхні природних або синтетичних матеріалів, включення їх у полімерні матеріали, порожнисті волокна та мембранні капсули, поперечна хімічна зшивка. Принципи цих технологій в даний час набули широкого розвитку у зв'язку з новим напрямом біотехнології «Інженерна ензимологія». При іммобілізації ферментів відбувається стабілізація каталітичної активності; іммобілізований фермент, що має обмежену можливість для конформаційних перебудов, швидше розчинного знаходить найкоротший шлях до функціонально активної конформації. Це дозволяє організовувати на базі іммобілізованих ферментів ефективні біотехнологічні процеси багаторазової періодичної, а також безперервної дії з використанням принципу взаємодії рухомої та нерухомої фаз.

Принципи іммобілізації ферментів все більш широко використовуються в даний час для іммобілізації клітин, призначених для низки біотехнологічних процесів – біоорганічного синтезу, детекції ряду сполук, деградації та зв'язування токсикантів.

Відомі різні методи іммобілізації: адсорбційні методи та методи хімічного зв'язування на поверхні, методи механічного включення або захоплення; методи хімічного приєднання. **М 5.**

Методи іммобілізації шляхом адсорбції засновані на фіксуванні ферменту на поверхні різних матеріалів – неорганічних (силікагель, пористе скло, кераміка, пісок, обпалена глина, гідроксиди титану, цирконію, заліза) та органічних (хітин, целюлоза, поліетилен та ін).

Адсорбція – це найпростіший метод іммобілізації ферментів. Процедура іммобілізації полягає у змішуванні в певних умовах ферменту з носієм та інкубації суміші. Потім за допомогою фільтрування та центрифугування проводять відділення нерозчинного компонента суміші від розчинного. Адсорбція – м'який метод іммобілізації. Недолік цього методу – неміцність зв'язків. Тому при незначній зміні умов середовища

(pH , температури, іонної сили, концентрації продукту) можлива десорбція клітин із поверхні носія.

Найбільш поширеним методом іммобілізації клітин є включення до полімерної структури (метод механічного захоплення). Для цього застосовують різні матеріали: альгінат Na, желатин, карагінан, колаген, хітин, целюлозу, поліакриламід. Завись клітин змішують з розчином мономерів носія. Далі створюють умови процесу полімеризації, під час якої відбувається механічне включення клітин у структуру носія. Важливим моментом є рівномірність розподілу клітин в обсязі носія та однорідність одержуваних агрегатів. Техніка включення залежить від природи та властивостей використовуваного матеріалу, біосистемі, що утворюються при цьому мають вигляд гранул, волокон, полімерних сіток, плівок тощо.

На практиці для іммобілізації клітин широко застосовують поліакриламідний гель (ПААГ), клітини вносять у розчин мономеру (N, N1-метилендіакриламіду). Далі формується гель у виді блоку. Монолітний гель подрібнюють, надаючи частинкам форму кубиків бажаного розміру. При використанні желатину або агар-агару спочатку підігрівають їх розчини, потім охолоджують і вносять фермент. У процесі подальшого охолодження відбувається формування гелю. Полімеризація альгінату Na відбувається у присутності деяких катіонів. Тому на першому етапі змішують розчини ферменту та мономерів цих полісахаридів, далі суміш за допомогою дозуючого пристрою вносять у розчин, що містить іони Ca^{2+} або Ba^{2+} (для альгінату Na) або Al^{3+}, Fe^{3+} , K^{+} або Mo^{2+} (для карагінану Na), при цьому утворюються полімерні сферичні частинки у вигляді гранул.

Гелі в залежності від природи полімерного матеріалу, що використовується, відрізняються за рядом показників. Наприклад, гелі ПААГ недостатньо міцні, але цього можна уникнути при використанні ПААГ, що містить тверду арматуру з кераміки. Альгінатні гелі відрізняються високою міцністю та хорошими гідродинамічними властивостями, що не створює перешкод для притоку до активних

центрів молекул ферментів субстрату та відтоку продукту, що утворюється. При роботі з альгінатом кальцію важливою є відсутність в іммобілізаційній системі хелатувальних агентів (фосфатів, цитратів), які руйнують структуру гелю, пов'язуючи кальцій.

Клітини, іммобілізовані на поверхні або порах носія, або включені в полімерні матрикси, використовуються в ряді процесів, перш за все, для очищення стічних вод, газоповітряних викидів тощо.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4

Іммобілізація клітин дріжджів

Мета роботи: навчання принципам іммобілізації клітин мікроорганізмів методом механічного захоплення (включення в гелі різних типів).

Матеріали та обладнання:

Біомаса пекарських дріжджів, альгінат Na, 0,2 М розчин $CaCl_2$, 0,1 М розчин натрій-фосфатного буфера, акриламід у наборі з компонентами для полімеризації та утворення поліакриламідного гелю (ПААГ), 0,9 % фізіологічний розчин, агар-агар, нейлонова сіточка, магнітна мішалка, шприц-дозатор, склянки, шпателі, чашки Петрі, скальпель.

Хід роботи

Провести включення клітин з використанням трьох матриксів: альгінату Na, ПААГ та агар-агару, біомасу пекарських дріжджів ресуспендувати в 0,2 М калій-фосфатному буфері при pH 7,0.

Включення дріжджових клітин у ПААГ

1. Приготувати 7 % розчин ПААГ.
2. У розчин ПААГ внести клітини в концентрації 0,1; 0,2; 0,4 та 0,6 г/мл (за сирою речовиною) і добре перемішати клітини та охолодити до 1 °С.
3. Охолоджену суміш клітин та розчину носія розлити у чашки Петрі шаром 2 мм і витримувати протягом 30 хв.
4. Сформований гель подрібнити, використовуючи скальпель, отримуючи частинки у вигляді кубиків розміром 2 х 2 х 2 мм.
5. Отриманий препарат іммобілізованих клітин зберігати у фосфатному буфері в побутовому холодильнику.

Включення дріжджових клітин до альгінату Na

1. Приготувати розчин альгінату натрію (0,1 г сухого препарату в 10 мл води) з дріжджовими клітинами (0,5 г сирих клітин/мл).

2. Приготувати 100 мл 0,2 М розчину $CaCl_2$.

3. Суміш, що містить розчин альгінату Na та дріжджові клітини, при постійному перемішуванні на магнітній мішалці за допомогою шприца дозувати у приймальну ванну (скляний стаканчик з розчином $CaCl_2$). У міру проходження крапель через товщу розчину під впливом іонів кальцію відбувається полімеризація альгінату і формуються гранули діаметром 2,0–2,5 мм.

4. Отриманий препарат іммобілізованих клітин зберігати у фосфатному буфері в побутовому холодильнику.

Включення клітин дріжджів у гель агар-агару

1. Приготувати розчин агар-агару. Для цього розчинити 100 мг агар-агару в 4,5 мл 0,9 % $NaCl$ шляхом нагрівання до 100 °С, а потім охолодити до 50 °С.

2. Приготувати суспензію клітин дріжджів шляхом розчинення 10-30 мг у 100 мл 0,9 % $NaCl$.

3. Додати 0,5 мл суспензії клітин до 4,5 мл розчину агар-агару при 50 °С і суміш перемішати на магнітній мішалці.

4. Вилити суміш на сіточку та охолодити до 5 °С.

5. До використання зберігати отриману мембрану з іммобілізованими клітинами дріжджів у 0,1 М розчині натрій-фосфатного буфера при pH 7,0.

У протоколі відзначити хід роботи та отримані результати.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 5

Включення α-амілази в гель альгінату кальцію

Реактиви та обладнання

Альгінат Na, 0,2 М $CaCl_2$, α-амілаза, шприц-дозатор з голкою діаметром 1 мм для формування гранул, магнітна мішалка.

Хід роботи

1. Приготувати 4 % розчин альгінату Na, для чого 400 мг сухого препарату альгінату Na розчинити у 9,6 мл дистильованої води.
2. Приготувати 0,1 % розчин α-амілази, для чого 10 мг сухого препарату α-амілази розчинити в 10 мл дистильованої води.
3. Обережно змішати рівні об'єми розчину альгінату натрію та розчину α-амілази (по 5 мл).
4. Приготувати 0,2 М розчин $CaCl_2$, для чого 2,22 г $CaCl_2$ розчинити у 100 мл дистильованої води.
5. Набрати отриману суміш у шприц і з висоти 20 см капати суміш із шприца в ємність, що містить розчин $CaCl_2$ (на 10 мл розчину альгінату Na необхідно 100 мл $CaCl_2$).
6. Залишити отримані частинки альгінату Ca з включеним ферментом у розчині $CaCl_2$ на 20 хв для затвердіння.

У протоколі відзначити хід роботи та отримані результати.

Отримання лікувального покриття для ран та опіків на основі протеолітичних ферментів

Реактиви та обладнання

Полівініловий спирт (ПВС), дистильована вода, трипсин, натрій-фосфатний буфер (0,1 М, pH = 7,4), 1 % розчин бури.

Хід роботи

1. Приготувати 15 % розчин полівінілового спирту (ПВС) на дистильованій воді. Нагріти до повного розчинення при перемішуванні і потім охолодити до кімнатної температури.
2. Приготувати 0,2 % розчин трипсину (400 мг трипсину в 20 мл) у натрій-фосфатному буфері (0,1 М; pH = 7,4).
3. Приготувати 10 мл 1 % розчину бури на дистильованій воді.
4. Марлю, розміром 25 х 10 см просочити розчином бури та висушити до постійної ваги.
5. Акуратно змішати рівні об'єми (по 10 мл) розчину ПВС та розчину трипсину і просочити отриманою сумішшю підготовлену марлю.
6. Марлю помістити на скляну пластину та висушити до постійної ваги.

Перевірити збереження протеолітичної активності модифікованим методом Ансона.

Для приготування 100 мл натрій-фосфатного буфера використовують: 0,8 г $NaCl$, 0,02 г KCl, 0,144 г Na_2HPO_4, 0,024 г KH_2PO_4; розчиняють у 80 мл дистильованої води; доводять pH до 7,4 соляною кислотою або гідроксидом натрію; додають дистильованої води до 100 мл.

У протоколі відзначити хід роботи та отримані результати.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 6

Визначення амілолітичної та протеолітичної активності нативних та іммобілізованих ферментів

Визначення амілолітичної активності нативного та іммобілізованого ферментів

Реактиви та обладнання

Нативний фермент α-амілази та α-амілаза, іммобілізована в альгінат Ca, натрій-фосфатний буфер (0,1 М, pH = 7,4), 1 % розчин крохмалю в 0,5 н ацетатному буфері (pH = 4,7), 0,0025 % розчин йоду, 0,1 % розчин α-амілази у натрій-фосфатному буфері (0,0666 М, pH = 7,4).

Хід роботи

1. 5 мл розчину ферменту або 10 мг іммобілізованого препарату α-амілази поміщають у 5 мл натрій-фосфатного буфера (0,1 М, pH = 7,4) і інкубують 5 хв при 37 °С.

2. Додають 10 мл 1 % розчину крохмалю в 0,5 н ацетатному буфері (pH = 4,7), утриманого при 37 °С.

3. Контрольний розчин являє собою 10 мл 1 % розчину крохмалю в 5 мл дистильованої води.

4. Через 10 хв із суміші відбирали 0,5 мл, які вносили в 50 мл 0,00025 % розчину йоду. Вимірювали оптичну щільність контрольного та дослідного розчинів при 600 нм.

Амілолітичну активність (АА) розраховували за формулою:

$$AA = \frac{(D_к - D_о) * 100}{D_к * 10 * n},$$

де $D_к$ – оптична щільність контрольного розчину, $D_о$ – оптична щільність дослідного розчину, 100 – кількість крохмалю, взяте для випробування як субстрат, мг, 10 – час інкубації, хв, n – наважка препарату.

Амілолітична активність виражається кількістю крохмалю, розщепленого 1 г препарату амілази за 1 хв.

У протоколі відзначити хід роботи та отримані результати для різних зразків амілази.

Визначення протеолітичної активності нативного та іммобілізованого ферментів

Реактиви та обладнання

Нативний фермент трипсин, іммобілізований у полівініловий спирт трипсин, натрій-фосфатний буфер (0,0666 М, pH = 7,4), 2 % розчин казеїну в натрій-фосфатному буфері (0,0666 М, pH = 7,4), 10 % розчин трихлороцтової кислоти.

Хід роботи

Протеолітичну активність визначали модифікованим методом Ансона.

1. Пробірку, що містить 1 мл ферментного розчину або еквівалентну кількість іммобілізованого трипсину в 1 мл натрій-фосфатного буфера, інкубували 5 хв при 37 °С.

2. Після інкубації додавали 2 мл термостатованого при 37 °С 2 % розчину казеїну в тому ж фосфатному буфері.

3. Точно через 10 хв інкубації з казеїном вносили 5 мл 10 % розчину ТХО, перемішували та залишали на 10 хв при 37 °С.

4. У контрольній пробі до 1 мл розчину ферменту додавали 5 мл розчину ТХО та потім 2 мл розчину казеїну.

5. Отриманий осад відфільтровували за допомогою складчастого фільтра.

6. Проводили визначення білка методом Лоурі. У 3 пробірки наливають по 1 мл розчину білка, а в четверту 1 мл дистильованої води. У всі пробірки додають 0,9 мл реактиву А (2% розчин Na_2CO_3 у 0,1 М розчині $NaOH$). Пробірки нагрівають 10 хв при 50 °С, охолоджують і

додають 0,1 мл реактиву (0,5 % розчин $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1 % розчині виннокислого натрію). Розчини залишають при кімнатній температурі на 10 хв, потім швидко вносять 3 мл реактиву (реактив Фоліна розведений у співвідношенні 1 : 15), нагрівають 10 хв при 50 °С, охолоджують і визначають оптичну щільність.

Концентрацію продуктів протеолізу визначали по збільшенню оптичної щільності фільтратів при 650 нм у порівнянні з контролем.

Протеолітичну активність (ПА) розраховували за формулою:

$$\text{ПА} = \frac{(D_0 - D_K)}{[C]},$$

де D_K – оптична щільність контрольного розчину, D_0 – оптична щільність дослідного розчину, $[C]$ – концентрація ферменту, г.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 7

Отримання біосенсора для напівкількісного визначення білка в сечі

Нині для визначення білка в сечі дедалі частіше використовуються діагностичні смужки. Для напівкількісного визначення білка в сечі на смужці як індикатор найчастіше використовується барвник бромфеноловий синій в цитратному буфері. Про вміст білка в сечі судять за інтенсивністю синьо-зеленого забарвлення, що розвивається після контакту реакційної зони із сечею. Результат оцінюється візуально чи з допомогою аналізаторів сечі. Чутливість індикатора заснована на більшій спорідненості бромфенолового синього до альбуміну, ніж до інших білків. Чутливість визначення білка 0,1-0,15 г/л. Смужки дозволяють напівкількісне визначення білка (як альбуміну) до концентрації 10 г/л і більше.

Реактиви та обладнання

Бромфеноловий синій (0,1 % розчин), цитратний буфер (pH 3,0): лимонна кислота – 21,01 г, 1 н розчин NaOH – 200 мл, дистильована вода – до 1 літра. Розчин альбуміну в дистильованій воді [C] = 0,1 – 5,0 г/л.

Хід роботи

1. Приготувати 0,1 % розчин бромфенолового синього на цитратному буфері (10 мл).

Спосіб приготування цитратного буфера (pH = 3,0):

Розчин цитрату натрію (0,1 М) об'ємом 40,3 мл помістити в колбу на 100 мл і до мітки розбавити розчином 0,1 М HCl. Розчин цитрату готується наступним чином: до 21,014 г моноводної лимонної кислоти додається 200 мл розчину NaOH (0,1 М), а потім суміш розбавляється водою до 1 літра.

2. Лист фільтрувального паперу 10х10 см помістити у ванну, що містить 10 мл розчину бромфенолового синього.

3. Витримати протягом 5 хв.

4. Помістити на скло та висушити до постійної ваги.

5. Розрізати на смужки 0,5 х5 см.

6. Використовувати для напівкількісного визначення білка у сечі.

7. У приготовлені розчини альбуміну [С] = 0,1-5 г/л помістити тест-смужки.

8. Отримані результати занести до таблиці.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8

Хемілюмінесценція біологічних об'єктів

Хемілюмінесценцією (ХЛ) називають свічення, що супроводжує деякі біохімічні реакції. Наявність такого світіння означає, що енергія, що виділяється на одній із стадій хімічного процесу, який протікає в системі, виявляється достатньою для утворення одного з продуктів реакції в електронно-збудженому стані, що при переході потім у основний стан випускає кванти люмінесценції:

$$A + B \rightarrow P^* + \text{інші продукти (хемілюмінесцентна реакція);}$$

$$P^* \rightarrow P + h\nu \text{ (люмінесценція).}$$

Квантовий вихід хемілюмінесценції в таких реакціях має порядок величини 10^{-8}. Застосування активаторів хемілюмінесценції дозволяє суттєво посилити її інтенсивність. За механізмом дії активатори поділяються на дві групи, які можна назвати ***хімічними*** та ***фізичними*** активаторами. Хімічні активатори хемілюмінесценції, звані також ХЛ-зондами – це сполуки, що вступають у реакції з АФК (активними формами кисню) або вільними органічними радикалами, при цьому утворюються молекули продуктів у збудженому електронному стані. Свічення, що спостерігається при цьому, пов'язане з переходом молекул в основний стан, що призводить до висвічування фотонів:

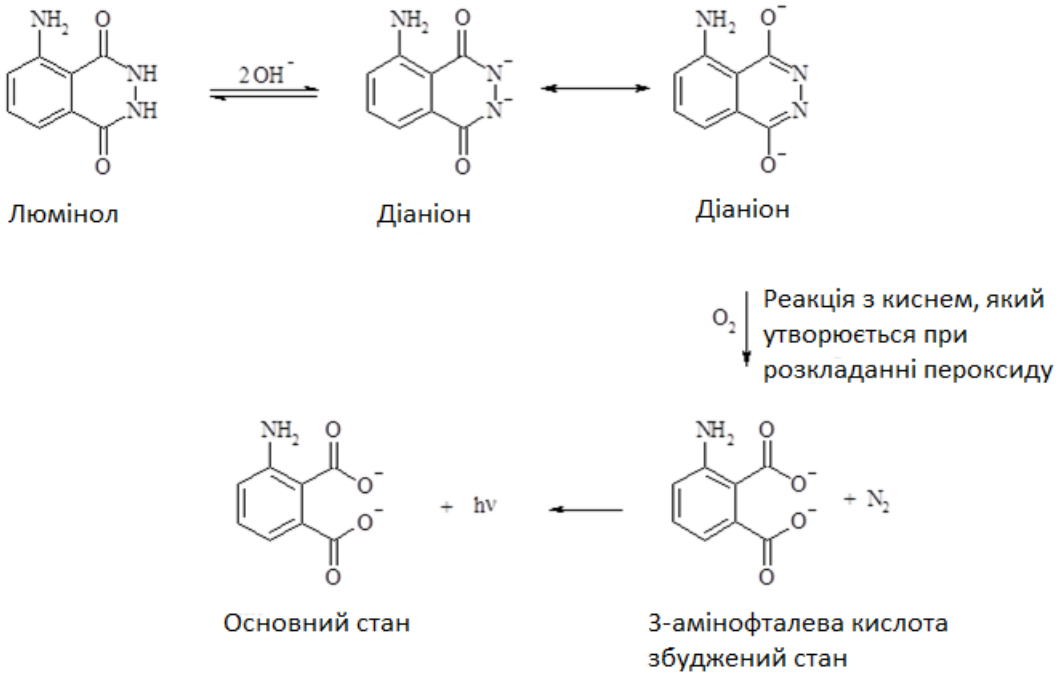
Активатор + радикали → продукт* → продукт + *фотон.*

Добре відомим представником таких активаторів може бути люмінол.

Хемілюмінесцентні властивості люмінолу виявляються у присутності окислювачів. Для цього може бути використаний пероксид водню (H_2O_2) у розчині луга.

У присутності каталізаторів, таких як солі заліза (наприклад, червона кров'яна сіль), пероксид водню розкладається з утворенням кисню та води. При взаємодії люмінолу з гідроксид-іонами утворюється дианіон, який взаємодіє з киснем. Продуктом цієї реакції є вкрай

нестабільний органічний дирадикал, який миттєво розпадається з утворенням азоту та молекули 3-амінофталевої кислоти у збудженому електронному стані. При поверненні молекули із збудженого в основний електронний стан виділяється фотон.



Реактиви та обладнання

Люмінол, 0,1 М розчин КОН, 10 % розчин пероксиду водню, свіжий корінь хріну, кров лабораторних тварин (щур), центрифуга, пробірки, піпетки.

Хід роботи

1. Отримують екстракт шляхом очищення та подрібнення коренів хріну з подальшою обробкою на гвинтовому пресі з нержавіючої сталі.
2. Отриманий екстракт центрифугують при 5000 об/хв протягом 15 хв.
3. Готують лужний розчин люмінолу (0,1 г люмінолу розчиняють у 10 мл 0,1 М КОН).

4. До розчину люмінолу додають 4 мл свіжоприготовленого 10 % розчину пероксиду водню.

5. Розчин, що містить люмінол і перекис водню, поміщають у темне місце та додають 2 мл рослинного екстракту.

6. Спостерігають хемілюмінесценцію одержаного розчину, активовану взаємодією люмінолу з пероксидазою, що знаходиться в екстракті хріну.

7. Аналогічно проводять дослід ще раз, додаючи замість екстракту хріну 0,2 мл крові лабораторних тварин (щур), попередньо взяту з серця або хвостової вени тварини.

У протоколі зазначають результати проведеної роботи, вказуючи причину та механізм виникнення хемілюмінесценції.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Біотехнологія мікробного синтезу: навчальний посібник. НУБіП України. Патика Т. І., Патика М. В. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2018: 272 с.
2. Біотехнологія: вступ до фаху: навч. посіб. Кляченко О. Л., Пилипенко Л. А., Іванова Т. В. К.: Аграр. наука, 2018: 392 с.
3. Фармацевтична біотехнологія. Аспекти фармацевтичної хімії. Ю. М. Краснопольский, О. В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ» (2018). – 248 с.
4. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник. М. Д. Мельничук, О. Л. Кляченко, В. В. Бородай, Ю. В. Коломієць. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2014: 253 с.
5. Пирог Т. П., Пенчук Ю. М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник – К.: Видавництво Ліра-К, 2019. – 258 с.
6. Грегірчак Н. М., Антонюк М. М., Буценко Л. М. Іммобілізовані ферменти і клітини в біотехнології: навч. посіб. — К.: НУХТ, 2015. – 267 с.
7. Основи біотехнології [Текст] : навч. посіб. / О. О. Кравченко, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко ; Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. - Київ : Київський університет, 2019. – 269 с.
8. Біотехнологія. Т.2: Генетична та клітинна інженерія. Екобіотехнологія / [Воронкова О. С. та ін.]: навч. посіб. ; Дніпр. нац. ун-т ім. Олеся Гончара, Каф. сучас. технологій діагност.-лікув. процесу. – Дніпро : Ліра, 2019. – 155 с.
9. Сучасні тенденції розвитку біотехнологій в біології та фармації: навч.-методич. посіб. / укл. Тугай Т. І., Поєдинок Н. Л., Сергійчук Н. М., Катинська М. Г. – К. : «Талком», 2019. – 125 с.

Навчальне видання

БІОТЕХНОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до лабораторних робіт студентів факультету хімії та фармації
першого (бакалаврського) рівня освіти
спеціальності 102 «Хімія», ОПП «Фармацевтична хімія»

Електронне практичне видання

Укладачі:
Грицук Олександр Іванович
Цісак Альона Олександрівна

В авторській редакції

Затвердж. авт. 15.08.2023. Шрифт Times New Roman.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним
забезпеченням для читання файлів формату PDF.
Обсяг 0,8 МБ. Зам. № 2630.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua