

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАУ**

**БІОЛОГО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

*Кафедра хімії*

## **МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

### **Біохімія одержання та дослідження ферментних препаратів та біологічно активних речовин**

до виконання практичних робіт та самостійної  
роботи здобувачами першого (бакалаврського) рівня  
вищої освіти спеціальності  
G21 «Біотехнології та біоінженерія»

Біла Церква  
2026

Ухвалено науково-методичною радою  
Білоцерківського національного аграрного  
університету (Пр. № 1 від 26.08.2025 р.)

Укладачі: Цехмістренко С.І., проф., Цехмістренко О.С., проф.,  
Поліщук В.М., доц., Поліщук С.А., доц., Роль Н.В., доц., Гаюк Н.В., доц.

Біохімія одержання та дослідження ферментних препаратів та  
біологічно активних речовин: методичні рекомендації / уклад.  
С.І. Цехмістренко та ін. Біла Церква, 2026. 38 с.

Методичні рекомендації підготовлено з метою поглиблення  
знань про біохімічні основи отримання, очищення та аналізу  
ферментних препаратів і біологічно активних речовин (БАР). Вони  
охоплюють теоретичну частину, де розглянуто біосинтез і регуляцію  
активності ферментів, джерела отримання та методи культивування  
продуцентів, основи виділення, очищення й концентрування  
ферментів, а також аналітичні методи дослідження їх активності.  
Практична частина містить докладні методики визначення  
активності ключових ферментів за класичними і сучасними  
спектрофотометричними підходами. Окремі розділи присвячено  
вибору оптимальних умов дії ферментів, контролю якості препаратів  
та практичним рекомендаціям щодо їх зберігання й стандартизації

Матеріали можуть бути використані під час виконання  
лабораторних і самостійних робіт, курсових проєктів і дослідницької  
практики.

Рецензенти:

**Данченко О.О.**, д-р с.-г. наук, професор кафедри харчових  
технологій та готельно-ресторанної справи Таврійського  
державного агротехнологічного університету;

**Михайленко О.В.**, канд. хім. наук, доцент кафедри  
супрамолекулярної хімії Інституту високих технологій Київського  
національного університету імені Тараса Шевченка.

© БНАУ, 2026

## ВСТУП

Дисципліна «Біохімія» є однією з фундаментальних складових підготовки майбутніх фахівців спеціальності «Біотехнології та інженерія», адже вона формує розуміння хімічної природи живих систем, механізмів обміну речовин і енергії, структурно-функціональних властивостей біомолекул, а також закономірностей біохімічної регуляції клітинних процесів. Знання біохімії є основою для усвідомлення сутності біотехнологічних процесів – від ферментації до синтезу цільових продуктів, очищення та стабілізації біологічно активних речовин. Сучасний біотехнолог повинен не лише володіти технічними навичками роботи в лабораторії, а й глибоко розуміти молекулярні механізми, що лежать в основі життєдіяльності клітин, мікроорганізмів, ферментів та метаболічних мереж. Саме біохімія дає змогу пояснити, чому певні умови культивування, рН, температура чи співвідношення елементів живлення так суттєво впливають на швидкість росту культури, синтез метаболітів або активність ферментів.

Мета вивчення дисципліни «Біохімія» полягає у формуванні в студентів системних знань про структуру, властивості та функції основних класів біомолекул (білків, ферментів, вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот, вітамінів), засвоєнні принципів біохімічних процесів, які відбуваються у живих клітинах, та розумінні механізмів їх регуляції. Водночас дисципліна орієнтована на набуття практичних навичок у роботі з біологічними об'єктами, вимірюванні активності ферментів, оцінюванні метаболічних показників, підготовці біохімічних препаратів і визначенні їх якості. Біохімія є тим містком, що поєднує фундаментальні знання природничих наук із прикладними аспектами біотехнології, екології, харчової та медичної промисловості.

Окремий розділ – «Біохімія одержання та дослідження ферментних препаратів і біологічно активних речовин (БАР)» – має на меті поглибити розуміння студентами молекулярних механізмів дії ферментів та принципів отримання цільових біопродуктів у лабораторних і промислових умовах. Цей розділ знайомить студентів із методами виділення, очищення, концентрування та стабілізації ферментів, а також із сучасними підходами до

визначення їхньої активності, кінетичних параметрів і стабільності. У межах курсу розглядаються питання оптимізації середовищ і технологічних параметрів культивування продуцентів, впливу індукції, катаболітної репресії, рН, температури, концентрації джерел вуглецю й азоту на синтез цільових продуктів.

Завдання розділу полягає у формуванні в студентів здатності самостійно планувати та проводити експериментальні дослідження з отримання ферментів і БАР, аналізувати отримані результати та робити науково обґрунтовані висновки. Студенти мають опанувати методи визначення активності амілаз, протеаз, ліпаз, оксидаз, редуктаз та інших ферментів, навчитися користуватися спектрофотометричними і хроматографічними методами, розуміти сутність процесів очищення і стабілізації білкових препаратів. Не менш важливим є засвоєння принципів контролю якості ферментних препаратів – чистоти, питомої активності, стійкості до інгібіторів та температури.

Дисципліна «Біохімія» посідає ключове місце в освітній програмі підготовки біотехнологів і тісно пов'язана з рядом суміжних курсів. Вона безпосередньо спирається на знання з органічної та неорганічної хімії, які забезпечують розуміння хімічної будови й реакційної здатності біомолекул. Тісний зв'язок існує з мікробіологією, адже більшість промислових ферментів та біологічно активних речовин отримують саме мікробного походження. Біотехнологічні процеси вимагають знань з біохімії для керування метаболізмом продуцентів і підвищення виходу цільових продуктів.

Фізико-хімічні методи аналізу (спектрофотометрія, хроматографія, електрофорез) використовуються для кількісного визначення біохімічних показників і контролю чистоти препаратів. Отже, біохімія є фундаментом для подальшого вивчення таких дисциплін, як молекулярна біологія, генно-інженерні технології, промислова біотехнологія, нанобіотехнологія та екологічна біотехнологія.

У результаті опанування курсу студент повинен **знати** структуру та властивості основних класів біомолекул, біохімічні основи метаболізму, принципи регуляції ферментативних реакцій, методи одержання, виділення та аналізу ферментів і БАР. Він має

**уміти** самостійно проводити експериментальні дослідження, правильно готувати розчини та буферні системи, визначати активність ферментів, оцінювати вплив різних факторів на швидкість реакції, будувати графіки залежності активності від температури, рН, концентрації субстрату. Випускник повинен **володіти навичками** роботи з біохімічними приладами (спектрофотометром, центрифугою, термостатом, рН-метром тощо), оброблення експериментальних даних, статистичної оцінки результатів, дотримання правил біологічної та хімічної безпеки.

Таким чином, курс «Біохімія» є не лише теоретичною основою біотехнології, а й практичним інструментом для формування у студентів цілісного уявлення про живі системи на молекулярному рівні. Саме на базі біохімічних знань формується здатність розробляти нові біотехнологічні процеси, оптимізувати умови культивування, створювати ефективні ферментні препарати та інші біологічно активні сполуки, що є важливими для сталого розвитку аграрної, харчової, медичної та екологічної галузей.

## **1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА**

### **1.1. Біохімічні основи біосинтезу ферментів і біологічно активних речовин**

Біосинтез ферментів і біологічно активних речовин – це основа життєдіяльності всіх живих організмів і ключовий процес, який лежить в основі сучасної біотехнології. Ферменти є білковими каталізаторами, які керують хімічними реакціями у клітинах, а біологічно активні речовини (БАР) – це різні сполуки, що мають фізіологічну дію (вітаміни, антибіотики, амінокислоти, органічні кислоти, пігменти тощо). Для біотехнолога важливо розуміти, як ці речовини утворюються, які фактори впливають на їх синтез і як можна керувати цими процесами, щоб отримувати необхідні продукти у промислових умовах.

Біосинтез ферментів починається з того, що у клітині зчитується генетична інформація з ДНК. На її основі синтезується матрична РНК, яка переносить «інструкцію» для побудови білка. Далі рибосоми «зчитують» цю інформацію і збирають білковий ланцюг із амінокислот. Після синтезу білок складається у просторову форму, без якої він не зможе працювати. Деякі

ферменти додатково поєднуються з небілковими частинами – металами або вітамінами (кофакторами), які необхідні для їх активності. Якщо фермент виробляється для зовнішнього середовища (наприклад, амілаза або протеаза), він транспортується через клітинну мембрану і виділяється назовні.

У природі синтез ферментів регулюється потребами клітини. Якщо у середовищі з'являється певна речовина (наприклад, крохмаль), клітина «вмикає» вироблення ферменту, який може її розщеплювати (амілаза). Коли ця речовина зникає, синтез ферменту припиняється. Такий механізм називається **індукцією**. І навпаки – якщо в середовищі багато кінцевого продукту реакції, клітина може тимчасово **пригальмувати синтез ферменту**, щоб не витратити зайві ресурси.

Біосинтез біологічно активних речовин також підпорядковується закономірностям клітинного метаболізму. Частину таких речовин клітина утворює під час свого росту – це амінокислоти, білки, нуклеотиди, органічні кислоти, тобто **первинні метаболіти**, без яких клітина не може існувати. Інші сполуки з'являються на пізніших етапах росту або під впливом певних умов – це **вторинні метаболіти**, до яких належать антибіотики, пігменти, ароматичні речовини, поліфеноли тощо. Їх клітини синтезують не для власного росту, а як засіб захисту, взаємодії або конкуренції з іншими мікроорганізмами.

Для біотехнолога важливо знати, які умови найбільше впливають на синтез ферментів і БАР. Найголовнішими є **джерела живлення**, співвідношення елементів **C:N:P**, температура, рН, наявність кисню та мікроелементів (Fe, Mn, Zn, Mg, Ca). Наприклад, при нестачі азоту мікроорганізми часто переходять до утворення вторинних метаболітів, у тому числі антибіотиків. Оптимальне значення рН і температури важливе для правильного функціонування ферментів: при занадто високій температурі вони руйнуються, а при занадто низькій – втрачають активність.

Синтез ферментів та БАР можна регулювати також технологічно. У біотехнологічних процесах для цього використовують контрольовані умови в біореакторах: підтримують постійну температуру, концентрацію кисню, рН, перемішування та подачу живильних речовин. Змінюючи ці параметри, можна

спрямовувати обмін речовин клітин у потрібний бік – наприклад, підвищити синтез амілази, ліпази або поліфенолів.

Для отримання ферментів часто використовують мікроорганізми – бактерії (наприклад, *Bacillus subtilis* для амілаз і протеаз), гриби (*Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*) або дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*). Їх культивують у середовищах, що містять доступні джерела вуглецю, азоту, фосфору і мікроелементи. Після культивування ферменти виділяють із культуральної рідини, очищують і досліджують їх активність.

Таким чином, біохімічні основи біосинтезу ферментів і біологічно активних речовин полягають у знанні того, як у клітині перетворюється енергія, як керується робота генів, і як зовнішні умови впливають на ці процеси. Біохімічне розуміння цих механізмів дозволяє не лише пояснювати природні явища, але й **цілеспрямовано керувати біосинтезом**, створюючи умови для отримання цінних ферментів і сполук у промислових масштабах. Саме тому цей розділ біохімії є основою для подальшого вивчення біотехнологічних дисциплін і практичного використання знань у виробництві ферментних препаратів, харчових добавок, лікарських засобів та екологічно чистих біотехнологічних продуктів.

## **1.2. Субстрати та джерела одержання ферментних препаратів**

Субстрати та джерела одержання ферментних препаратів визначають собою «паливо» і «майстерню» біотехнологічного процесу: з чого живиться продуцент і звідки саме ми беремо потрібний фермент. Важливо запам'ятати просту логіку: фермент виробляє живий організм (найчастіше мікроорганізм), а щоб він працював і синтезував потрібний білок, йому потрібне збалансоване поживне середовище з вуглецевим джерелом, азотом, мінеральними солями, мікроелементами, іноді – вітамінами та речовинами-«підказками» (індукторами). Найчастіше як продуцентів використовують бактерії (наприклад, *Bacillus subtilis* для амілаз і протеаз), мікроскопічні гриби (*Aspergillus niger* для пектиназ і глюкозооксидази, *Trichoderma reesei* для целюлаз), дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae* – інвертаза, *Kluveromyces lactis* – лактаза). Є й рослинні та тваринні джерела (папаїн із латексу папайї, бромелайн з ананаса, трипсин із підшлункової залози), але в

промисловості переважає саме мікробне виробництво: воно швидше, керованіше і, як правило, дешевше.

Вуглецеве джерело – це головний «будівельний матеріал» і джерело енергії. Його підбирають під конкретний фермент і штам. Для амілаз зручно давати крохмаль або його гідролізати; для інвертази – сахарозу; для лактази – лактозовмісну сироватку; для целюлаз – целюлозні відходи (тирса, подрібнена солома); для ліпаз – жири й олії (іноді у вигляді емульсій). Дуже часто використовують дешеві агропромислові залишки: меляса (побічний продукт цукроваріння), кукурудзяний екстракт, сироватка молочна, барда, висівки, лушпиння соняшникове, рисове лушпиння, жом буряковий, тростинний багас. Такі субстрати не лише здешевлюють процес, а й роблять його «зеленішим», перетворюючи відходи на ресурс. Перед подачею їх інколи подрібнюють, звожують, желатинізують крохмаль (щоб зробити його доступнішим), емульгують олії або проводять легкий гідроліз клітковини, щоб прискорити старт росту.

Азотне живлення потрібне для синтезу білка – отже, прямо впливає на швидкість утворення ферменту. Тут можливі два підходи: органічний азот (пептон, дріжджовий екстракт, триптон, кукурудзяний екстракт) дає швидкий «поштовх» і часто підвищує вихід, а неорганічний (аміачна селітра, сульфат амонію, сечовина) – дешевший і зручний для масштабування. На практиці поєднують обидва, підбираючи співвідношення так, щоб клітина мала достатньо «цеглинок» для білкового синтезу, але не «залипала» на надмірному рості на шкоду секреції ферменту. Важливо пам'ятати: кальцій стабілізує амілази й деякі протеази, магній потрібен рибосомам і багатьом ферментам, цинк – металоферментам, залізо – оксидоредуктазам. Фосфати виконують подвійну роль: і як поживний елемент, і як буфер, що тримає стабільне рН.

Окрема корисна ідея – індуктори. Це сполуки, які «вмикають» у клітини синтез потрібного ферменту. Класичні приклади прості: ксиліоза стимулює ксиланази, крохмаль – амілази, лактоза – лактазу, рослинні олії – ліпази, казеїн – протеази. Малими дозами індуктора ми ніби підказуємо продуценту, що саме зараз «актуальне», і він перебудовує свою генетичну програму відповідно. Водночас надлишок «легких» цукрів (наприклад, глюкози) інколи пригнічує

синтез деяких ферментів – це називають катаболітною репресією, і це ще одна причина уважно підбирати склад середовища.

Тип субстрату і його фізична форма визначають і сам формат культивування. У рідкому середовищі (глибинна ферментація) легше контролювати рН, кисень і температуру; такий підхід зручний для більшості бактеріальних і дріжджових продуцентів, а також для грибів-секреторів (наприклад, для глюкоамілаз). Якщо ж маємо справу з твердими або малорозчинними сировинами (висівки, лушпиння, багас), добре працює твердофазне культивування: субстрат зволожують, засівають грибом і підтримують вологість та температуру. Саме в такому режимі гриби природно синтезують і виділяють позаклітинні ферменти, розщеплюючи волокна рослинної сировини. Твердофазний варіант енергетично дешевший і чудово підходить для регіонів з надлишком агровідходів, але потребує акуратного контролю вологості, вентиляції і чистоти.

При виборі субстратів є кілька простих, але корисних правил. По-перше, доступність і стабільність: краще брати те, що є поруч і постійно (м'яса, висівки), ніж рідкісний і дорогий компонент. По-друге, відсутність інгібіторів: фенольні речовини, важкі метали, мийні засоби, залишки пестицидів здатні пригнічувати ріст і синтез ферментів; інколи достатньо попереднього промивання, нейтралізації або сорбції на активованому вугіллі. По-третє, зручність подальшого очищення продукту: барвники м'яса або масла можуть ускладнювати очистку; якщо колір або в'язкість середовища заважають аналітиці та виділенню, шукаємо світліші або менш в'язкі аналоги. По-четверте, буферність і вода: стабільне рН зменшує денатурацію і автоліз ферменту, а якісна вода без надлишку солей жорсткості та хлору полегшує контроль процесу.

Класичні «зв'язки» між джерелом і ферментом легко запам'ятати як короткі пари: крохмаль/відходи борошномельного виробництва → амілази (*Bacillus*, *Aspergillus*); тирса/солома → целюлази (*Trichoderma*); сироватка молочна → лактаза (*Kluyveromyces*); сахароза/жом → інвертаза (*Saccharomyces*); казеїн/м'ясокісткове борошно → протеази (*Bacillus*, *Aspergillus*); рослинні олії/жири → ліпази (*Candida*, *Rhizopus*); цитрусові відходи/шкірка фруктів → пектинази (*Aspergillus*). Такі приклади

зручні для планування лабораторних робіт: ми відразу розуміємо, який субстрат використати, щоб «підштовхнути» продуцента виробляти саме той фермент, що потрібен.

Ще одна практична деталь – прості композиції середовищ. Для старту часто достатньо базової «трійки»: джерело вуглецю (наприклад, 20–30 г/л крохмалю або 40–60 г/л меляси), джерело азоту (2–5 г/л пептону або 1–3 г/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  плюс 1–2 г/л дріжджового екстракту), буфер/фосфати (1–3 г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 0,5–1 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), магній (0,2–0,5 г/л  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), кальцій за потреби (0,1–0,5 г/л  $\text{CaCl}_2$ ), мікроелементний розчин краплями, індуктор у невеликій кількості (наприклад, 0,5–2 г/л ксилози для ксиланаз або 0,1–0,5% олії для ліпаз). Далі параметри уточнюють експериментально: коригують рН (часто 5,0–6,0 для грибів і 6,5–7,5 для бактерій), швидкість аерації, ступінь перемішування, щоб уникнути нестачі кисню або піноутворення.

Нарешті, про безпеку й якість. Варто працювати з безпечними, добре вивченими штамми (GRAS – «загалом визнані безпечними»), стерилізувати субстрати та апаратуру, дотримуватись санітарних вимог, щоб у культурі не з'явилися «чужі» мікроорганізми, які занижують вихід або руйнують фермент. Якість субстрату контролюють вологістю, вмістом золи, білка, цукрів, відсутністю плісняви і сторонніх запахів; стабільність партій важлива для відтворюваності результатів. У підсумку правильний вибір субстратів і джерел одержання – це поєднання здорового глузду (що доступне й чисте), біохімічної логіки (що саме «вмикає» потрібний фермент) і технологічної зручності (що легко контролювати та потім очищувати). Коли ці три речі зійшлися, продуцент стабільно росте, індукується потрібний шлях, фермент секретується у середовище, а ми отримуємо високий вихід активного препарату з мінімальними витратами й зайвими кроками на очищення.

### **1.3. Біотехнологічні методи культивування продуцентів**

Біотехнологічні методи культивування продуцентів – це набір підходів, що дають змогу вирощувати мікроорганізми (бактерії, дріжджі, мікроскопічні гриби) або клітини так, щоб вони швидко росли й утворювали потрібні ферменти чи інші корисні сполуки. Процес завжди починається з чистої культури та правильно

підготовленого «ланцюжка посівів»: спочатку невеликий посів у пробірку або колбу, далі – більша колба (насінна культура), і лише потім – перенесення в біореактор. Такий процес потрібен для того, щоб у виробничий апарат потрапила активна, здорова культура, яка швидко стартує й не забруднена сторонніми мікроорганізмами. Весь шлях супроводжується стерильністю: посуд, середовища й повітря для аерації стерилізують, роботу виконують біля пальника або в ламінарній шафі, інструменти обпалюють чи обробляють спиртом.

Є два базові формати культивування – у рідкому середовищі (глибинна ферментація) та на зволжених твердих субстратах (твердофазне культивування). Глибинна ферментація зручна тим, що її легко контролювати: у біореактор подають стерильне повітря, рН і температуру тримають постійними, перемішування забезпечує однаковий розподіл поживних речовин і кисню. Саме так вирощують більшість бактерій і дріжджів, а також грибів, які добре секретують ферменти у рідину (наприклад, глюкоамілазу, протеази). Твердофазне культивування використовують, коли субстрати – це агровідходи на кшталт висівков, лушпиння чи подрібненої соломи: їх зволожують, засівають грибом і підтримують вологість та температуру. Перевага – дешевизна й висока активність екзоферментів, недолік – складніше рівномірно керувати умовами, ніж у рідині.

У рідких процесах важливо розуміти режими: **партіальний (batch)** – коли всі поживні речовини вносять одразу, і культура росте до вичерпання субстрату; **підживлюваний (fed-batch)** – коли ключовий компонент (цукор, азот чи індуктор) додають поступово, щоб не пригнічувати синтез ферменту й уникнути «залипання» на надлишковому рості; **безперервний (continuous)** – коли свіже середовище постійно надходить у біореактор, а культуральну рідину відводять із тією ж швидкістю. Fed-batch – найгнучкіший: він дає змогу «кермувати» обміном речовин у потрібний бік, піднімаючи вихід ферменту.

Біореактор – «серце» процесу. У ньому контролюють **температуру** (щоб фермент не руйнувався і клітина не перегрівалася), **рН** (щоб активні центри ферментів залишалися в роботі), **розчинений кисень** ( $O_2$  потрібен аеробним культурам для

енергії та правильного складання білків), **швидкість перемішування та аерації** (вони визначають, як швидко гази та поживні речовини доходять до клітин). Якщо піна заважає, додають харчовий антипінний засіб; якщо середовище забіднене на мікроелементи, вносять «мікроелементний коктейль» у дуже малих дозах. Для індукції потрібних ферментів використовують «підказки»: краплю ксилози для ксиланаз, трошки крохмалю для амілаз, трохи олії для ліпаз – так клітина «розуміє», який інструмент їй вигідно виробляти.

Щоб культура росла прогнозовано, середовище будують із кількох простих блоків: джерело вуглецю (цукри, крохмаль, гідролізати, меляса), джерело азоту (дріжджовий екстракт, пептон або сульфат амонію/сечовина), фосфати як буфер, солі магнію й кальцію, мікроелементи (Fe, Zn, Mn, Cu), вода без хлору. Співвідношення **C:N:P** задає, скільки клітина піде «в масу», а скільки – у синтез ферментів: надлишок «легких» цукрів інколи гальмує деякі ферменти (катаболітна репресія), тому підживлення подають обережно й порціями. Для грибів зручно працювати при слабкокислому рН (близько 5–6), для бактерій – ближче до нейтрального (6,5–7,5); температура і аерація підбираються під конкретний штам.

Контроль процесу спирається на прості вимірювання: оптична густина або суха маса (щоб знати біомасу), рН, розчинений кисень, інколи – гази на виході ( $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ), а головне – **активність цільового ферменту** у пробах культуральної рідини. Якщо активність зростає повільно – коригують подачу субстрату, рН або індуктор; якщо фермент швидко втрачає активність – знижують температуру або додають стабілізатори (кальцій для деяких амілаз, гліцерол чи білкові захисники). Важливо також слідкувати за протеазами продуцента: коли їх багато, вони можуть «поїдати» наш фермент; тоді добирають інший штам, інший рН або додають м'які інгібітори протеолізу.

Після закінчення культивування культуральну рідину відокремлюють від клітин (центрифугування, фільтрація) і переходять до виділення та очищення ферменту. Якщо фермент секретований у середовище – це спрощує очищення; якщо внутрішньоклітинний – клітини лізують (ультразвук, ферменти,

осмотичний шок) і далі працюють з екстрактом. Варто пам'ятати, що спосіб вирошування впливає на подальші кроки: наприклад, темні середовища (меляса) ускладнюють спектрофотометрію, а жирні добавки – фільтрацію, тому інколи обирають «світліші» чи менш в'язкі рецептури.

Окремо згадаємо два практичні інструменти. **Імобілізовані клітини** (коли мікроорганізм «посаджений» у гель або на носій) корисні для тривалих процесів і багаторазового використання біокатализатора, а **рециркуляційні або «рухомі» носії** (типу біофільтрів/MBBR) зручні для аеробних культур: на поверхні носія росте біоплівка, яка добре дихає і стабільно виробляє фермент. Достатньо знати ідею: носій дає клітині «дім», а ми отримуємо більш стійкий процес.

Безпека – постійне правило: працюємо з безпечними штамми, дотримуємося стерильності, ведемо журнал процесу (дата, склад середовища, інокулюм, рН, температура, швидкості подачі), утилізуємо відходи після автоклавування. Якщо дотримано чистоти, правильно підготовлено інокулюм і уважно керовано умовами (рН, температура, кисень, підживлення), продуцент стабільно росте й секретує потрібний фермент, а ми отримуємо високу активність при мінімальних витратах і без непотрібних переробок на етапі очищення. У цьому й полягає суть біотехнологічного культивування: простими керованими «ручками» переводити метаболізм клітини у той режим, де вона максимальна корисна для нашого завдання.

#### **1.4. Виділення, очищення та концентрування ферментів і БАР**

Виділення, очищення та концентрування ферментів і біологічно активних речовин (БАР) – це послідовність простих кроків: спочатку обережно відділяють цільову молекулу від решти клітинних компонентів, потім прибирають домішки, підвищуючи чистоту, і в кінці робиться розчин більш «щільним» (концентруємо) та стабілізують препарат для зберігання. Найзручніше думати про процес як про «тракт» із кількох станцій: підготовка зразка → відокремлення твердого й рідкого → первинне захоплення цільової речовини → проміжне очищення → тонке (фінішне) очищення → концентрування й формуляція (стабілізація). Який саме маршрут

обирати, залежить від того, де міститься продукт: якщо фермент або БАР секретуються у середовище (позаклітинні), то з ними працювати легше – просто очищають культуральну рідину. Якщо вони всередині клітин (внутрішньоклітинні), спершу треба «відкрити» клітину.

Починають із підготовки. Культуральну рідину або біомасу охолоджують (низька температура зберігає активність ферментів), додають буфер із потрібним рН (найчастіше близько до робочого рН ферменту), інколи – солі кальцію або магнію для стабілізації, а також м'які інгібітори протеаз, щоб цільовий фермент не розщепився «власними» протеазами. Якщо продукт внутрішньоклітинний, проводять лізис клітин: механічно (ультразвук, гомогенізація, French-press, кульки у шейкері), осмотично (швидка зміна солоності) або з м'якими лізуючими ферментами (лізоцим для бактерій). Після лізису суміш завжди «прояснюють»: відокремлюють тверді частинки центрифугуванням або фільтрацією, щоб отримати прозорий екстракт.

Далі йде первинне «захоплення» та грубе очищення. Класичний і доступний прийом для білків – висолювання сульфатом амонію («солянка»): поступово додаючи сіль, осаджують білки за їх розчинність, відфільтровують осад і знову розчиняють у буфері. Альтернатива – осадження холодним етанолом або ацетоном (для БАР це теж корисно), а також осадження при ізоелектричній точці (підібрати рН, за якого білок найгірше розчиняється). Після осадження зазвичай проводять діаліз або ультрафільтрацію, щоб прибрати надлишок солей і дрібні домішки та перевести препарат у «правильний» буфер.

На етапі проміжного й фінішного очищення вибір методу залежить від природи молекули. Для білків (ферментів) широко застосовують іонообмінну хроматографію (білки з різним зарядом зв'язуються з по-різному зарядженими смолами й елююються сольовим градієнтом), гель-фільтрацію (розділення за розміром: великі – виходять швидше), гідрофобну взаємодію (корисна для білків з гідрофобними ділянками) та афінну хроматографію (найвибірковіша: фермент зв'язується зі «своїм» лігандом на смолі і відмивається м'яко, наприклад зміною рН або додаванням конкуренту). Іноді частину очищення заміняє іммобілізація:

фермент «садять» на носій (агароза, силікагель, полімерні гранули), і небажані білки просто змиваються – так ми одночасно отримуємо і більш чистий, і зручний у використанні біокатализатор. Для БАР (небілкових молекул) частіше йдуть шляхом екстракції розчинниками (вода/етанол/бутанол залежно від полярності), рідинно-рідинного розподілу, рН-перекладу (переведення кислоти в сіль і навпаки для кращої розчинності), сорбції на макропористих смолах або твердофазної екстракції (SPE). «Зелені» розчинники (етанол, вода, іоно- або глибокі евтектичні рідини) бажані там, де продукт піде в харчові або фармацевтичні застосування.

Після досягнення потрібної чистоти переходять до концентрування і формуляції. Концентрують ультрафільтрацією (мембрани з певним «порогом» молекулярної маси), вакуум-випарюванням при зниженій температурі або осадженням з подальшим розчиненням у меншому об'ємі. Для довготривалого зберігання ферменти зазвичай ліофілізують (заморожене висушування у вакуумі), додаючи стабілізатори – цукри (сахароза, трегалоза), білкові захисники (желатин, БСА), поліоли (гліцерол), іони кальцію для окремих амілаз і протеаз. Якщо процес економічно доцільний, можливе розпилювальне сушіння (spray-dry), але температуру підбирають обережно, щоб не втратити активність. Рідкі ферментні препарати зберігають у буферах при 2–8 °С, іноді з невеликою кількістю консервантів і стабілізаторів; БАР часто переводять у сухі екстракти або капсулюють (наприклад, у альгінат), щоб підвищити стійкість до окиснення, світла та вологи.

Якість контролюють на кожному кроці простими тестами. Для ферментів – активність у стандартному тесті (одиниці активності на мілілітр або грам), питома активність (од/мг білка), вихід (%) від початкового, стабільність при заданих рН і температурі, а також чистоту (спектрофотометрично за  $A_{280}$ , електрофорез SDS-PAGE як навчальний стандарт). Для БАР – вміст цільової сполуки (спектрофотометрія/флуориметрія/ВЕРХ за можливості), профіль домішок, волога, колір/запах (для харчових), стійкість до зберігання. Важливо простежувати й «несумісності»: меляса дає фон у видимому спектрі, масла ускладнюють фільтрацію, а залишкові органічні розчинники можуть інактивувати білки – ці

речі враховують ще на етапі вибору середовища й «м'яких» розчинників.

Є кілька простих правил, що допомагають зберегти активність і підняти вихід. Завжди працюйте «холодно» (лід, охолоджені буфери), швидко переходьте від лізису до прояснення, підтримуйте рН у зоні стабільності ферменту, мінімізуйте піноутворення та контакт із повітрям для чутливих БАР, додавайте стабілізатори одразу після виділення. Плануйте маршрут від кінцевої мети: якщо потрібен харчовий або фармацевтичний продукт, відразу обирайте харчові/«зелені» реагенти й матеріали та дбайте про стерильність і низький рівень ендотоксинів/мікробних домішок. Якщо ж мета – технічний фермент (для пральних порошоків, кормів), інколи достатньо «середньої» чистоти, і можна зупинитися на іонообміні + ультрафільтрації без дорогого «полішингу».

У підсумку, успішне виділення, очищення та концентрування – це не про «складні прилади», а про послідовність і логіку: спершу акуратно відокремити від усього зайвого, потім дати молекулі «легкий шлях» через кілька селективних кроків, і нарешті зафіксувати її у зручній для зберігання формі. Дотримуючись цих простих принципів, навіть у навчальній лабораторії можна отримати активний ферментний препарат або стабільний екстракт БАР із передбачуваною якістю та хорошим виходом.

### **1.5. Методи дослідження активності ферментів і БАР**

Методи дослідження активності ферментів і біологічно активних речовин ґрунтуються на простому принципі: ми створюємо зрозумілу для ферменту «ситуацію» (субстрат, рН, температура, час), дозволяємо реакції коротко попрацювати й об'єктивно вимірюємо, скільки продукту утворилося або скільки субстрату зникло. Найперше правило – працювати у стандартних умовах і фіксувати їх: буфер із заданим рН, стабільна температура (зазвичай 25–37 °С), точна концентрація субстрату, сталий час інкубації. Друга базова ідея – оцінювати початкову швидкість реакції, коли утворення продукту відбувається лінійно з часом. Активність ферменту зазвичай виражають в одиницях «U» (1 U = 1 мкмоль продукту за хвилину) на мл розчину або на мг білка, а «питома активність» дозволяє судити про чистоту ферментного

препарату. Для коректних підрахунків потрібні холості проби (без ферменту або без субстрату), повні контролі, калібрувальна крива «сигнал ↔ кількість речовини», повтори й прості обчислення середнього значення та похибки.

Найчастіше активність вимірюють оптичними методами. Спектрофотометричні тести базуються на тому, що продукт або реагент має характерне забарвлення чи поглинає світло на певній довжині хвилі. Для амілаз і глікозидаз беруть субстрати, які після гідролізу дають відновні цукри й забарвлюються з 3,5-динітросаліциловою кислотою (DNS), далі вимірюють оптичну густину і за калібрувальною кривою в перерахунку на глюкозу визначають кількість продукту. Для протеаз часто застосовують казеїн як субстрат: після гідролізу вільні ароматичні амінокислоти реагують із реактивом Фоліна і дають синє забарвлення, яке фіксують у спектрофотометрі; альтернативою є хромогенні короткі пептиди, що при розщепленні вивільняють р-нітрофенол (поглинання близько 405 нм). Для ліпаз широко використовують р-нітрофенілові ефіри жирних кислот (наприклад, р-нітрофенілпальмітат): звільнений р-нітрофенол легко виміряти. Для оксидоредуктаз корисними маркерами є NADH/NADPH, які мають інтенсивне поглинання на 340 нм: зменшення або збільшення цього сигналу прямо показує хід реакції. Інший простий варіант – ферментні «зв'язки» з пероксидазою та барвниками (ABTS, TMB): якщо досліджуваний фермент утворює  $H_2O_2$ , пероксидаза перетворює барвник у кольорову форму, і ми вимірюємо її спектрально. Флуориметричні тести працюють так само, але використовують флуорогенні субстрати з більш високою чутливістю, що зручно при дуже малих активностях. Манометричні підходи сьогодні застосовують рідше, але ідея проста: за ферментації відстежують споживання кисню чи виділення  $CO_2$ , перераховуючи це в активність.

Щоб зрозуміти, в яких умовах фермент працює найкраще, будують прості залежності «активність–рН» і «активність–температура». Для цього одну змінну змінюють, а решту тримають сталою: наприклад, вимірюють активність у різних буферах зі сталістю концентрації субстрату, або при різних температурах у термостаті. Криві зазвичай мають чіткий максимум – це оптимум.

Окремо перевіряють термостабільність: інкубують фермент певний час за підвищеної температури, а потім вимірюють, яка частина активності збереглася. Важливі також тести на вплив іонів і інгібіторів: додавання кальцію інколи стабілізує амілази та деякі протеази, тоді як хелатуючі агенти (наприклад, ЕДТА) вимикають металоферменти; зміна активності під дією невеликих концентрацій реагентів підказує роль кофакторів і особливості активного центру. Якщо потрібно, проводять найпростіший кінетичний експеримент: змінюють концентрацію субстрату й вимірюють початкову швидкість; це дає уявлення про насичуваність системи ( $V_{\max}$ ) і «спорідненість» ферменту до субстрату (умовний показник –  $K_m$ ).

Методи оцінки біологічно активних речовин підпорядковані тій самій логіці, але пристосовані до природи сполуки. Для загального вмісту білка в екстрактах зручно є реакція Бредфорда (барвник Кумассі), яка дає інтенсивне синє забарвлення з максимумом поглинання у видимій області; за калібрувальною кривою на основі альбуміну обчислюють концентрацію білка. Антиоксидантну активність часто оцінюють тестами DPPH або ABTS: відновлення стабільних радикалів приводить до зменшення забарвлення, і це зменшення ми вимірюємо спектрофотометрично, порівнюючи з еталоном (кверцетин, аскорбінова кислота чи тролокс). Для фенольних сполук застосовують реактив Фоліна-Чокальтеу, результат подають у «галовій кислоті-еквівалентах». Вітамін С можна визначити простою йодометричною титрацією або спектрофотометрично, органічні кислоти – через кислотно-основне титрування або (коли доступний прилад) рідинну хроматографію. Пігменти, як-от каротиноїди, мають характерні максимуми поглинання у видимій області, тож їхню кількість також легко оцінити спектрально; для хлорофілу і каротиноїдів використовують стандартизовані довжини хвиль і коефіцієнти перерахунку. У будь-якому з цих тестів важливо зробити «бланк» (середовище без цільової речовини), адже власний колір або мутність зразка можуть додавати помилку.

Правильна підготовка проби часто вирішує половину задачі. Ферменти чутливі до нагрівання та екстремальних значень рН, тому всі розчини готують у буферах і тримають холодними,

працюють швидко, за потреби додають м'які інгібітори протеаз, а чутливі БАР захищають від світла та кисню (темні флакони, мінімізація аерації). Субстрат готують свіжим і ретельно перемішують, щоб уникнути градієнтів концентрації. Якщо середовище має власний колір (наприклад, з м'яси), зразок розбавляють або проводять «вирахування фону» на відповідній довжині хвилі. Для порівнянності між серіями завжди використовують одну і ту саму довжину хвилі, кювети з однаковою товщиною шару та однаковий час інкубації.

Обробка результатів повинна бути настільки ж акуратною, як і експеримент. Спочатку будують калібрувальну криву «концентрація – сигнал» (наприклад, мкг глюкози ↔ оптична густина при 540 нм), перевіряють лінійність (бажано високий коефіцієнт детермінації), а вже потім підставляють значення із дослідних проб. Отриману кількість продукту ділять на час інкубації – це початкова швидкість; перерахунок у мікромолі на хвилину дає активність у «U». Ділення на об'єм ферментного розчину дає U/мл, а ділення на масу білка – питому активність (U/mg), що особливо корисно для порівняння чистоти на різних етапах очищення. Якщо проводили серії при різних рН або температурах, будують прості графіки й визначають оптимум; якщо змінювали концентрацію субстрату – дивляться, чи досягли насичення та як змінюється швидкість.

Нарешті, важливо пам'ятати про прості засади якості й безпеки. Всі вимірювання роблять у щонайменше трьох повтореннях, відбраковують явні «викиди», коротко описують умови (буфер, рН, температура, час) і записують дату з номером зразка. Скляний посуд і кювети мають бути чистими, без подряпин, а спектрофотометр перед роботою – прогрітий і обнулений на контрольній пробі. Робота з біологічними зразками ведеться у рукавичках, а залишки реактивів утилізуються відповідно до інструкцій. Дотримуючись цих нескладних кроків – стандартні умови, правильні контролю, акуратні вимірювання та зрозумілі розрахунки – можна надійно оцінити активність ферментів і кількість/властивості біологічно активних речовин, отримуючи відтворювані, порівнювані й корисні для подальшої роботи результати.

## 2. ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

### 2.1. Визначення активності ферментів і БАВ

#### 2.1.1. Визначення активності амілази (DNS-метод)

*Принцип методу.* Фермент гідролізує крохмаль до відновних цукрів. Відновні цукри реагують із 3,5-динітросаліциловою кислотою (DNS), утворюючи кольорову сполуку, яку вимірюють спектрофотометрично при 540 нм.

*Реактиви.* 1% крохмальний розчин у фосфатному буфері (рН 6,8–7,0); Реактив DNS (Miller, 1959); Стандартний розчин глюкози (0–1 мг/мл).

*Хід роботи.* Інкубувати проби (крохмаль + фермент) при 37°C впродовж 10 хвилин. Зупинити реакцію додаванням DNS-реактиву, кип'ятити 5 хвилин, охолодити, виміряти оптичну густину при 540 нм проти бланку.

*Розрахунок.* Побудувати калібрувальну криву «А540 – мкмоль глюкози». 1 одиниця активності (U) відповідає 1 мкмоль глюкози, утвореному за 1 хвилину реакції.

*Периоджерело:* Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

#### 2.1.2. Визначення активності протеази (казеїновий метод)

*Принцип методу.* Протеаза розщеплює казеїн до коротких пептидів, які не осаджуються трихлороцтовою кислотою (ТСА). Кількість розчинних пептидів визначають спектрофотометрично при 280 нм або через реакцію з реагентом Фоліна (Lowry, 1951).

*Реактиви.* 1% казеїн у фосфатному буфері (рН 7,5); 10% ТСА; Реагент Фоліна-Чокальтеу (для Lowry); Стандартний розчин тирозину (0–100 мкг/мл).

*Хід роботи.* Пробу з ферментом інкубують із казеїном при 37°C впродовж 10 хв. Реакцію зупиняють ТСА, охолоджують і центрифугують. У надосаді визначають кількість розчинних пептидів спектрофотометрично.

*Розрахунок.* 1 одиниця активності (U) = 1 мкмоль тирозину, утвореного за 1 хвилину реакції.

*Периоджерело:* Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *The Journal of general physiology*, 30(4), 291–310.

### **2.1.3. Визначення активності ліпази**

*Принцип методу.* Ліпаза гідролізує р-нітрофенілпальмітат, утворюючи р-нітрофенол, який має інтенсивне жовте забарвлення та поглинає при 405 нм.

*Реактиви.* р-нітрофенілпальмітат (pNPP) у Твін-80 або ізопропанолі; Tris-HCl буфер (рН 8,0); CaCl<sub>2</sub> (0,01 М) для стабілізації; Стандарт р-нітрофенолу.

*Хід роботи.* Змішати субстрат і буфер, прогріти до 37°C, додати фермент і відразу знімати А405 кожні 30 секунд впродовж 5–10 хв. Активність розраховують за зростанням А405 з часом.

*Розрахунок.* 1 U = 1 мкмоль р-нітрофенолу, утвореного за 1 хв при 37°C, рН 8.0.

*Першоджерело:* Bessey, O. A., Lowky, O. H., & Brock, M. J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. 164: 321–329.

### **2.1.4. Визначення активності фосфатази**

*Принцип методу.* Фермент фосфатаза каталізує гідроліз р-нітрофенілфосфату (pNPP) до р-нітрофенолу, який має максимум поглинання при 405 нм у лужному середовищі.

*Реактиви.* 5 мМ pNPP у діетаноламіновому буфері (рН 9,8); MgCl<sub>2</sub> (1 мМ) як кофактор; Стандарт р-нітрофенолу.

*Хід роботи.* Пробу ферменту додають до розчину pNPP у буфері при 37°C. Реєструють зростання А405 впродовж 5 хв. Швидкість реакції визначають за нахилом прямої на графіку А405 – час.

*Розрахунок.* 1 U = 1 мкмоль р-нітрофенолу/хв,  $\epsilon_{405} = 18,3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ .

*Першоджерело:* Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.

### **2.1.5. Визначення антиоксидантної активності**

*Принцип методу.* Антиоксиданти відновлюють фіолетовий радикал DPPH• до безбарвної форми. Зменшення оптичної густини при 517 нм пропорційне антиоксидантній активності.

*Реактиви.* 0.1 мМ розчин DPPH у метанолі; Стандарт тролоксу або аскорбінової кислоти; Метанол як бланк.

*Хід роботи.* У пробірці змішують 2 мл DPPH і 1 мл екстракту або стандарту. Інкують 30 хв у темряві, вимірюють А517.

Зменшення А517 у порівнянні з контролем відповідає антиоксидантній активності.

*Розрахунок.*

$$\text{Антиоксидантна активність (\%)} = \frac{\text{Аконтроль} - \text{Азразок}}{\text{Аконтроль}} * 100$$

Результати можна подати в мкмоль еквівалентів тролоксу (ТЕАС).

*Периоджерело:* Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25–30.

## 2.2. Визначення оптимальних умов дії ферментів

### 2.2.1. Визначення оптимального рН дії $\alpha$ -амілази

*Принцип методу.* Амілаза каталізує гідроліз крохмалю до мальтози та глюкози. Кількість відновних цукрів після реакції визначають за методом Міллера (DNS). Активність ферменту вимірюють у різних буферах (рН 4,0–9,0), зберігаючи сталі умови температури, часу та концентрації субстрату. Максимум активності на графіку відповідає оптимальному рН.

*Реактиви.* Субстрат: 1% крохмаль у дистильованій воді (свіжоприготований); Буфери (0,05 М): рН 4,0–5,5 – ацетатний; рН 6,0–7,5 – фосфатний; рН 8,0–9,0 – Tris–HCl; DNS-реагент: 1% 3,5-динітросаліцилова кислота, 0,2% фенол, 0,5% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> у 1% NaOH; Стандарт глюкози: 0–1 мг/мл.

*Хід роботи.* Підготувати серію реакційних сумішей (по 1 мл крохмалю та 1 мл буфера різного рН). Преінкубувати при 37 °С, додати 0,5 мл розчину  $\alpha$ -амілази. Через 10 хв зупинити реакцію 1 мл DNS-реагенту, прокип'ятити 5 хв, охолодити, довести до 10 мл і виміряти А540. Заповнити табл. 1 та побудувати графік.

Таблиця 1. Залежність активності  $\alpha$ -амілази від рН

| рН | A540 | Активність, % |
|----|------|---------------|
|    |      |               |
|    |      |               |
|    |      |               |
|    |      |               |
|    |      |               |
|    |      |               |
|    |      |               |
|    |      |               |
|    |      |               |
|    |      |               |

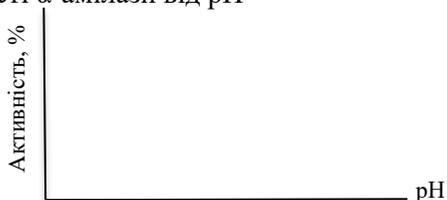


Рис. 1. Калібрувальна крива

*Розрахунок.* За калібрувальною кривою глюкози розрахувати мкмоль продукту/хв.  $1 U = 1$  мкмоль глюкози/хв. Побудувати «Активність (%) – рН», очікуваний оптимум рН 6,5–7,0.

*Першоджерело:* Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426–428.

### 2.2.2. Визначення оптимальної температури дії лужної фосфатази

*Принцип методу.* Фермент гідролізує р-нітрофенілфосфат (рNPP) до р-нітрофенолу, який має максимум поглинання при 405 нм у лужному середовищі. Швидкість реакції вимірюють при різних температурах за постійного рН та складу реакції.

*Реактиви.* Субстрат: 5 мМ рNPP у 0,05 М діетаноламіновому буфері (рН 9,8) з 1 мМ  $MgCl_2$ ; Буфер: 0,05 М діетаноламіновий, рН 9,8 (4,8 мл діетаноламіну + 0,1 М  $HCl$  до 100 мл); Фермент: лужна фосфатаза (комерційна або з екстракту тканини); Стоп-реагент: 0,1 М  $NaOH$  (за потреби).

*Хід роботи.* Підготувати проби з 1 мл субстрату та 0,1 мл ферменту. Інкубувати 5 хв при 20–55 °С, зупинити реакцію стоп-реагентом або охолодженням і виміряти А405 проти контролю без ферменту. Заповнити табл. 2 та побудувати графік.

Таблиця 2. Вплив температури на активність лужної фосфатази

| t °С | A405 | Активність, % |
|------|------|---------------|
|      |      |               |
|      |      |               |
|      |      |               |
|      |      |               |
|      |      |               |
|      |      |               |
|      |      |               |
|      |      |               |

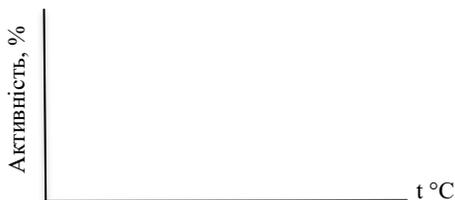


Рис. 2. Калібрувальна крива

*Розрахунок.*  $1 U = 1$  мкмоль р-нітрофенолу/хв ( $\epsilon_{405} = 18,3$   $mm^{-1} \times cm^{-1}$ ). Побудувати «Активність (%) – температура», очікуваний оптимум 37–40 °С.

*Першоджерело:* Bessey, O. A., Lowky, O. H., & Brock, M. J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. 164: 321–329.

### 2.2.3. Визначення термостабільності протеази (трипсину)

*Принцип методу.* Фермент інкубувати при різних температурах без субстрату, після чого вимірювати залишкову активність за гідролізом казеїну. Зниження активності відображає термічну інактивацію.

*Реактиви.* Фермент: трипсин 0,1 мг/мл у 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,5; Субстрат: 1% казеїн у 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,5; Буфер: 0,05 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,5; Стоп-реагент: 10% ТСА; Стандарт тирозину: 0–100 мкг/мл.

*Хід роботи.* Інкубувати зразки ферменту 10–30 хв при 30, 40, 50, 60 °С, швидко охолодити на льоду. Визначити активність: змішати фермент із казеїном, інкубувати 10 хв при 37 °С, зупинити ТСА, центрифугувати, виміряти А280 або А750 (Lowry).

Таблиця 3. Залишкова активність трипсину після нагрівання

| Температура, °С | Час, хв | А280 або А750 | Активність, % |
|-----------------|---------|---------------|---------------|
|                 |         |               |               |
|                 |         |               |               |
|                 |         |               |               |
|                 |         |               |               |

*Розрахунок.* Активність (%) =  $100 \times (\text{Упісля} / \text{Упочаткова})$ . За експоненційною апроксимацією визначити  $k_d$  і  $t_{1/2} = \ln 2 / k_d$ .

*Периоджерело:* Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *The Journal of general physiology*, 30(4), 291.

### 2.2.4. Вплив активаторів та інгібіторів на активність $\alpha$ -амілази

*Принцип методу.* Активність  $\alpha$ -амілази визначати за гідролізом крохмалю (DNS-метод) у присутності й відсутності активаторів та інгібіторів. Порівняння з контролем дає кількісну оцінку впливу сполук.

*Реактиви.* Субстрат: 1% крохмаль у 0,05 М фосфатному буфері, рН 6,8; Фермент:  $\alpha$ -амілаза ( $\approx 0,1$ – $0,2$  У/мл); Буфер: 0,05 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 6,8; Активатори/інгібітори (0,01 М):  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ , EDTA; DNS-реагент; стандарт глюкози 0–1 мг/мл.

*Хід роботи.* Приготувати серію проб із додаванням  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ , EDTA та контроль без добавок. Інкубувати 10 хв при 37 °С, зупинити DNS-реагентом, кип'ятити 5 хв, охолодити, довести до 10 мл і виміряти А540. Заповнити табл. 4.

Таблиця 4. Вплив активаторів та інгібіторів на активність  $\alpha$ -амілази

| Сполука           | Концентрація, мМ | A540 | Активність, % |
|-------------------|------------------|------|---------------|
| CaCl <sub>2</sub> |                  |      |               |
| CuSO <sub>4</sub> |                  |      |               |
| HgCl <sub>2</sub> |                  |      |               |
| EDTA              |                  |      |               |
| Контроль (вода)   |                  |      |               |

*Розрахунок.* Обчислити U/мл за калібруванням. Визначити відносну активність за формулою:

$$\text{Активність, \%} = \frac{U_{\text{дослід}}}{U_{\text{контроль}}} * 100$$

*Першоджерело:* Miller, G.L., Slater, R., Birzgalis, R. (1961). Application of different colorimetric tests to cellodextrins. Analytical biochemistry, 2 (6), 521-528.

### 2.3. Виділення ферментів із мікробної біомаси

#### 2.3.1. Виділення ферментів: одержання сирого екстракту з мікробної біомаси (центрифугування)

*Принцип методу.* Відокремити клітини від культуральної рідини центрифугуванням, промити осад для видалення сторонніх домішок, ресуспендовати біомасу в екстракційному буфері та отримати сирий екстракт після руйнування клітин і освітлення центрифугуванням високої швидкості.

*Реактиви та обладнання.* Екстракційний буфер (50 мМ Na-фосфат, рН 7,0; 1 мМ CaCl<sub>2</sub>; 1 мМ DTT за потреби); Лід/охолоджений штатив; Центрифуга (4 °С, до 20 000 g); Пробірки 15/50 мл, піпетки, циліндри.

*Хід роботи.* Зібрати культуру у фазі активного росту, охолодити на льоду, провести центрифугування при 4 000–8 000 g 10 хв за 4 °С. Злити супернатант, промити осад буфером і повторити центрифугування. Ресуспендовати осад у буфері (5–10 мл на 1 г біомаси), перемішати до однорідності, охолодити. Після руйнування клітин (див. ультразвук) провести освітлення лізату при 12 000–20 000 g 15–30 хв, 4 °С. Зібрати супернатант як сирий ферментний екстракт.

*Примітки.* Працювати «на холоді». Для екзоферментів досить освітлення культуральної рідини без лізису.

*Першоджерело:* Scopes, R.K. (1993). Protein purification: principles and practice. Springer Science & Business Media.

### **2.3.2. Руйнування клітин ультразвуком (дезінтеграція)**

*Принцип методу.* Ультразвукові імпульси створюють кавітацію, що розриває клітинні стінки та мембрани, вивільняючи внутрішньоклітинні ферменти.

*Реактиви та обладнання.* Суспензія клітин у 50 мМ Na-фосфатному буфері, рН 7,0; Ультразвуковий зондовий дезінтегратор 20–25 кГц; Крижана ванна для охолодження.

*Хід роботи.* Перенести суспензію у високу пробірку, занурити зонд на 1–2 см. Проводити імпульси 10 с роботи / 20 с паузи сумарно 3–8 хв, підтримуючи температуру  $\leq 10$  °С. Після обробки провести центрифугування 12 000–20 000 г, 15–30 хв, 4 °С. Зібрати супернатант як клітинний екстракт.

*Примітки:* Працювати в берушах, уникати піноутворення. Для стабілізації активності додавати 1 мМ CaCl<sub>2</sub> або 10 % гліцеролу.

*Периоджерело:* Deutscher, M. P. (Ed.). (1990). *Guide to protein purification* (Vol. 182). Gulf Professional Publishing.

### **2.3.3. Діаліз сирого екстракту (знесолення/обмін буфера)**

*Принцип методу.* Видалити низькомолекулярні компоненти (солі, інгібітори) через напівпроникну мембрану MWCO 10–12 кДа шляхом обміну з великим об'ємом буфера при 4 °С.

*Реактиви та обладнання.* Діалізна мембрана MWCO 10–12 кДа; Буфер: 50 мМ Na-фосфат, рН 7,0 або 50 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 10 % гліцерол; Мішалка, холодильник (4 °С).

*Хід роботи.* Замочити мембрану у воді, заповнити екстрактом, зав'язати й занурити у 100-кратний об'єм буфера. Діалізувати при 4 °С, замінюючи буфер через 2–3 год, тривалість 6–18 год. Після діалізу охолоджений екстракт перенести у пробірку, виміряти об'єм і активність ферменту.

*Примітки:* Для чутливих ферментів додавати 10 % гліцеролу, 1 мМ DTT. Уникати перегріву та надмірної втрати об'єму.

*Периоджерело:* Scopes, R.K. *Protein Purification*. Springer; Sambrook, J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press.

## **2.4. Імобілізація ферментів та побудова калібрувальних кривих**

### **2.4.1. Ентрапія ферменту в альгінатні гранули**

*Принцип методу:* Натрієвий альгінат утворює гель у присутності іонів Ca<sup>2+</sup>; змішування розчину ферменту з альгінатом і

крапельне внесення у хлорид кальцію дає сферичні гранули, що утримують фермент усередині матриці без ковалентних зв'язків.

*Реактиви та матеріали:* Розчин альгінату натрію 2,0% (w/v) у 50 мМ Na-фосфатному буфері, рН 7,0; Розчин CaCl<sub>2</sub> 0,2 М (свіжий, охолоджений); Буфер для інкубації/промивань: 50 мМ Na-фосфат, рН 7,0; 1 мМ CaCl<sub>2</sub>; α-амілаза у буфері (0,2–1,0 U/мл); Шприц, мішалка, лід.

*Хід роботи.* Охолодити всі розчини та посуд; приготувати суміш фермент+альгінат у співвідношенні 1:1 (наприклад, 5 мл α-амілази + 5 мл 2% альгінату), перемішати; внести краплями у 50 мл 0,2 М CaCl<sub>2</sub> під перемішуванням, утворюючи гранули 2–3 мм; витримати 30 хв при 4–8 °С, профільтрувати гранули, двічі промити буфером з 1 мМ CaCl<sub>2</sub>; зберігати при 4 °С або використовувати негайно у реакції (1 г гранул на 10 мл суміші).

*Контроль якості:* Визначити активність у надосаді та гранулах; розрахувати вихід іммобілізації (%).

*Примітки:* Оптимальний вміст альгінату 2,0–2,5%; надлишок знижує масоперенос.

*Першоджерело:* Bergmeyer, H.U. (Ed.). (2012). *Methods of enzymatic analysis*. Elsevier.

#### **2.4.2. Ковалентна іммобілізація на альдегід-активованому носії (на прикладі лужної фосфатази)**

*Принцип методу.* Аміногрупи білка утворюють шиффові основи з альдегідними групами носія (активованого глутаровим альдегідом), які стабілізуються редукцією NaBH<sub>3</sub>CN.

*Реактиви та матеріали.* Активованій носій (агароза, хітозан) після обробки 2,5% глутаровим альдегідом у 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,5; Лужна фосфатаза (0,1–0,5 мг/мл) у 50 мМ фосфатному буфері, рН 7,5; Буфери: 50 мМ фосфат рН 7,5; 1 М Tris–HCl рН 8,0; 0,1 М NaCl у фосфаті; NaBH<sub>3</sub>CN 10–20 мМ (редуктор); Холодильник 4 °С, мішалка, фільтри.

*Хід роботи.* Підготувати носій, активований глутаровим альдегідом; промити буфером; додати фермент у співвідношенні 5–10 мл/мл носія, інкубувати 2 год при 4 °С; додати NaBH<sub>3</sub>CN до 10–20 мМ, інкубувати 30–60 хв; відфільтрувати, промити 5×10 мл 50 мМ фосфатом рН 7,5; заблокувати залишкові альдегіди 1 М Tris–

HCl (30 хв), промити; зберігати іммобілізований фермент при 4 °С у робочому буфері.

*Контроль якості:* Визначити білок у проточних фракціях, обчислити ступінь завантаження (мг білка/мл носія) і активність (У/мл носія).

*Примітки:* Використовувати безамінні буфери під час зв'язування; NaBH<sub>3</sub>CN токсичний – робота в ШАФі.

*Першоджерело:* Deutscher, M.P. (ed.) Guide to Protein Purification. Academic Press.

#### **2.4.3. Калібрувальна крива глюкози для DNS-методу (A540)**

*Реактиви.* Сток глюкози 1,0 мг/мл; серія стандартів 0–1,0 мг/мл; DNS-реагент; водяна баня; спектрофотометр 540 нм.

*Хід роботи:* У пробірки внести 1,0 мл кожного стандарту та 1,0 мл DNS; прогріти 5 хв кип'ятінням; охолодити, довести до 10 мл, перемішати; виміряти A540 проти бланку; побудувати графік A540 проти концентрації глюкози; перевірити лінійність ( $R^2 \geq 0,995$ ).

*Примітки:* Для високого фону використовувати бланкування матрицею.

#### **2.4.4. Калібрувальна крива р-нітрофенолу для тестів рNPP/рNPPal**

*Реактиви.* Сток рNP 10 мМ у 0,1 М NaOH; робочі стандарти 0–400 мМ; буфер діетаноламіновий (рН 9,8) або Tris–HCl (рН 8,0); MgCl<sub>2</sub> 1 мМ; спектрофотометр 405 нм.

*Хід роботи.* Приготувати серію стандартів рNP, довести до 1 мл, виміряти A405 проти буфера; побудувати графік A405 проти [рNP]; підтвердити за  $\epsilon_{405}$  (18,3 мМ<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup>); використовувати для розрахунку активності ферменту.

*Примітки:* Контролювати дрейф субстрату без ферменту.

#### **2.4.5. Калібрувальна крива білка за Бредфордом (A595)**

*Реактиви.* Сток БСА 1,0 мг/мл; стандарти 0–30 мкг; реагент Бредфорда; спектрофотометр 595 нм.

*Хід роботи.* У пробірки внести стандарт БСА до 800 мкл, додати 200 мкл реагенту Бредфорда, перемішати, інкубувати 5–10 хв, виміряти A595 проти бланку; побудувати графік A595 проти маси білка; перевірити лінійність до 25 мкг.

*Примітки:* SDS >0,01% спотворює сигнал; уникати сурфактантів.

## **ФОРМИ ПОТОЧНОГО ТА ПІДСУМКОВОГО КОНТРОЛЮ**

Контроль знань студентів здійснюється у формі поточного, модульного та підсумкового оцінювання. Основними формами є:

*Фронтальне опитування на початку практичного заняття* – перевірка розуміння теоретичних основ теми, принципів методів і правил техніки безпеки.

*Тестові завдання* закритого та відкритого типу для самоконтролю.

*Оцінювання звіту з лабораторної роботи* – правильність оформлення таблиць, побудови графіків, розрахунків, обґрунтованість висновків.

*Індивідуальні завдання* (аналіз літератури, підготовка короткого повідомлення, розробка схеми експерименту).

*Підсумковий контроль (залік або іспит)* включає тестові запитання, усне опитування й розв'язання типових задач з визначення активності ферментів, оптимуму дії та аналізу результатів дослідів.

## **КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАВЧАННЯ**

Рівень засвоєння знань оцінюється за такими критеріями:

*Високий рівень* – студент упевнено володіє теоретичним матеріалом, пояснює механізми ферментативних процесів, уміє виконувати розрахунки і формулює висновки.

*Достатній рівень* – матеріал засвоєний, але допускаються незначні неточності у викладенні або оформленні.

*Середній рівень* – знання фрагментарні, є труднощі в поясненні механізмів і розрахунків.

*Низький рівень* – студент не орієнтується в основних поняттях, не може пояснити результати експерименту.

## **САМОСТІЙНА РОБОТА СТУДЕНТІВ**

Самостійна робота є важливою складовою засвоєння курсу «Біохімія» і спрямована на поглиблення знань та формування практичних навичок. Основні види самостійної роботи:

- ✓ опрацювання лекційного матеріалу та рекомендованої літератури;

- ✓ підготовка до лабораторних занять: ознайомлення з принципом методики, підбір буферів і реактивів, розрахунок концентрацій;
- ✓ оформлення лабораторних звітів і побудова графіків за отриманими даними;
- ✓ виконання індивідуальних завдань (аналіз статей, складання схем реакцій, підготовка короткої презентації або реферату);
- ✓ самоперевірка за тестовими питаннями й контрольними завданнями.

### **РЕКОМЕНДОВАНА ТЕМАТИКА САМОСТІЙНИХ РОБІТ**

1. Біосинтез ферментів і регуляція їх активності.
2. Сучасні методи визначення ферментативної активності.
3. Вплив фізико-хімічних факторів (рН, температура, іонна сила) на активність ферментів.
4. Методи виділення і очищення ферментів у лабораторній практиці.
5. Біохімічні основи дії антиоксидантів і визначення їх активності.
6. Використання ферментів у біотехнології, харчовій і медичній промисловості.

### **ЗАПИТАННЯ ТА ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ**

1. Дайте визначення поняття *фермент* та поясніть його роль у метаболізмі.
2. Які основні відмінності між ферментами та неорганічними каталізаторами?
3. Поясніть, що таке активний центр ферменту та які типи зв'язків забезпечують специфічність каталізу.
4. Які основні класи ферментів виділяють за типом реакції? Наведіть приклади.
5. Які чинники впливають на активність ферментів? Поясніть механізм дії температури та рН.
6. Що означає терміни *оптимум рН* і *оптимум температури* для ферменту?
7. Опишіть механізм дії  $\alpha$ -амілази та принцип DNS-методу визначення її активності.

8. У чому полягає сутність казеїнового методу визначення протеази?

9. Як визначають активність лужної фосфатази? Який принцип рNPP-тесту?

10. У чому полягає DPPH-метод оцінювання антиоксидантної активності зразка?

11. Поясніть, як побудувати калібрувальну криву та визначити питомі одиниці активності ферменту.

12. Що таке питома активність ферменту і як її використовують для оцінки чистоти препарату?

13. Які основні етапи виділення та очищення ферментів і біологічно активних речовин (БАР)?

14. Опишіть методи концентрування ферментних препаратів.

15. Які стабілізатори додають при ліофілізації ферментів і чому?

16. Поясніть різницю між внутрішньоклітинними та позаклітинними ферментами.

17. Які методи використовують для контролю чистоти та якості ферментних препаратів?

18. Опишіть, як визначають стабільність ферменту при зберіганні.

19. Наведіть приклади практичного використання ферментів у харчовій, медичній і біотехнологічній промисловості.

20. Як співвідноситься активність ферменту з концентрацією білка у зразку?

21. Які буфери найчастіше застосовують у ферментативних дослідженнях і чому?

22. Поясніть призначення контрольних і бланкових проб у спектрофотометричних вимірюваннях.

23. Як визначають коефіцієнт  $R^2$  і що він показує при побудові калібрувальної кривої?

24. Чим відрізняється одиниця активності (U) від специфічної активності (U/мг білка)?

25. Наведіть приклади методів визначення білка в біохімічних дослідженнях (Бредфорд, Лоурі).

26. Опишіть, як підготувати культуральну рідину для аналізу ферментів.

27. Які заходи безпеки необхідно дотримуватись під час роботи з ферментними препаратами?

28. Як оцінити точність і відтворюваність результатів біохімічного експерименту?

29. Які показники використовують для оцінки ефективності ферментного процесу?

30. Складіть схему етапів одержання ферментного препарату від культури продуцента до стабілізованої форми.

### ТЕСТОВІ ЗАПИТАННЯ З ДИСЦИПЛІНИ «БІОХІМІЯ»

1. Одиниця активності ферменту (1 U) означає кількість продукту, утвореного за: а) 1 нмоль/секунду; б) 1 ммоль/годину; **с) 1 мкмоль/хвилину**; д) 10 мкмоль/хвилину

2. У DNS-методі визначення активності амілази фотометричне вимірювання проводять при: а) 405 нм; б) **540 нм**; с) 595 нм; д) 517 нм

3. У тесті на ліпазу з р-нітрофенілпальмітатом (рNPP) реєструють утворення: а) р-амінобензойної кислоти; б) **р-нітрофенолу**; с) р-гідроксибензальдегіду; д) нікотинаміду

4. Для лужної фосфатази у стандартному рNPP-тесті часто використовують довжину хвилі: а) 340 нм; б) **405 нм**; с) 517 нм; д) 280 нм

5. У казеїновому методі протеази реакцію часто зупиняють: а) 96% етанолом; б) ацетоном; **с) 10% розчином ТСА (трихлороцтової кислоти)**; д) 0,1 М NaOH

6. DPPH-метод оцінює: а) активність оксидаз; б) вміст білка; **с) антиоксидантну здатність зразка**; д) термостабільність ферменту

7. Основна вимога до розрахунку активності – використовувати: а) максимальну швидкість за 60 хв; б) **початкову швидкість у лінійній ділянці**; с) мінімальну швидкість після насичення; д) усереднену швидкість за 2 години

8. Оптимум рН визначають, якщо: а) одночасно змінюють рН і температуру; б) **змінюють рН при сталих інших умовах**; с) змінюють лише концентрацію субстрату; д) змінюють іонну силу без контролю рН

9. Для побудови калібрувальної кривої в DNS-методі як стандарт часто беруть: а) мальтозу у 70% етанолі; б) **водні розчини**

**глюкози**; с) сахарозу в ацетатному буфері; d) фруктозу в Tris-буфері

10. Питома активність ферменту – це: а) U/мл буфера; б) **U/мг білка**; с) мг білка/мл; d) % інгібування/хв

11. Висолювання сульфатом амонію застосовують переважно для: а) зміни рН; б) **осадження та попереднього очищення білків**; с) визначення білка за Бредфордом; d) підвищення температури денатурації

12. Діаліз після висолювання потрібен для: а) підвищення іонної сили; б) екстракції ліпідів; с) **видалення надлишку солей та переходу у робочий буфер**; d) центрифугування клітин

13. Іонообмінна хроматографія розділяє білки за: а) гідрофобністю; б) **зарядом (рІ/стан іонізації при заданому рН)**; с) молекулярною масою; d) афінністю до ліганду

14. Гель-фільтрація (розмір-ексклюзія) передусім розділяє компоненти за: а) зарядом; б) **розміром/гідродинамічним радіусом**; с) спорідненістю до субстрату; d) розчинністю в органічних розчинниках

15. Афінна хроматографія базується на: а) різниці густини; б) **специфічній взаємодії «білок-ліганд»**; с) коагуляції білка; d) зміні іонної сили середовища

16. При визначенні активності за NADH/NADPH реєструють поглинання при: а) **340 нм**; б) 405 нм; с) 517 нм; d) 280 нм

17. Щоб запобігти втраті активності білків під час виділення, ключове: а) працювати при 50–60 °С; б) **«холодний ланцюг»: лід, охолоджені буфери, швидка обробка**; с) працювати на яскравому світлі; d) інтенсивно аерувати зразок

18. ЕДТА в буфері найімовірніше: а) активує металоферменти; б) **інгібує металоферменти (хелатує катіони)**; с) підвищує гідрофобність білків; d) знижує рН до 3,0

19. Для ліпаз як активатор/стабілізатор часто додають: а) KCl 1 M; б) CaCl<sub>2</sub> **низької молярності**; с) HCl 0,1 M; d) ЕДТА 10 мМ

20. У методі Бредфорда визначають: а) активність амілази; б) **вміст білка (A595)**; с) вміст фенолів (галова кислота); d) активність ліпази (A405)

21. Michaelis–Menten Km інтерпретують як: а) максимальна швидкість реакції; б) **псевдоспорідненість ферменту до субстрату**

( $S$  при  $v = 1/2 V_{max}$ ); с) константа інгібування; d) константа денатурації

22. Для оцінки термостабільності зазвичай: а) підвищують і знижують рН кожні 5 хв; б) **попередньо інкубують фермент при фіксованій  $T$  і вимірюють залишкову активність**; с) вимірюють оптичну густину при 280 нм один раз; d) змінюють іонну силу кожні 10 хв

23. Буфер для амілази в діапазоні рН 6,0–7,5 найчастіше: а) ацетатний; б) **фосфатний**; с) борний; d) карбонатний

24. У тестах із кольоровими реакціями обов'язковим є: а) повна відмова від бланку; б) **бланк/контроль для корекції фону та матриці**; с) інкубація у світлі; d) використання лише пластикових кювет

25. Імобілізація в альгінатні гранули – це приклад: а) ковалентної імобілізації; б) **ентрапії (захоплення в матрицю)**; с) іонообмінної імобілізації; d) метал-афінної імобілізації (His-tag)

26. Перевага імобілізованих ферментів: а) завжди вища питома активність; б) **можливість багаторазового використання і простіше відокремлення від продукту**; с) повна відсутність дифузійних обмежень; d) робота лише при кімнатній температурі

27. При побудові калібрувальної кривої «сигнал–концентрація» критично перевірити: а) тільки формулу тренда; б) **лінійність і коефіцієнт детермінації ( $R^2$ )**; с) температуру кип'ятіння DNS; d) колір буфера

28. Розчинений кисень у біореакторі важливий тому, що: а) визначає рН середовища; б) **забезпечує аеробний метаболізм і правильне складання білків**; с) збільшує іонну силу; d) знижує в'язкість середовища

29. Катаболітна репресія – це: а) активація генів за надлишку індуктора; б) **пригнічення синтезу певних ферментів за надлишку «легкого» субстрату (напр., глюкози)**; с) індукція синтезу амілази крохмалем; d) підвищення  $V_{max}$  при зниженні рН

30. Безпечна робота з біоматеріалом передбачає: а) роботу без журналу спостережень; б) сушіння зразків при 60 °С у відкритому повітрі; с) **рукавички, стерильність, утилізацію за інструкціями, маркування і журнал операцій**; d) заміну буферів водопровідною водою без стерилізації.

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Біологічна хімія: навчально-методичний посібник (для медичних факультетів). Львів: ЛНМУ ім. Данила Галицького, 2019.

Гонський Я.І. Біохімія людини: підручник. Тернопіль: ТДМУ, 2019. – 732 с.

Загайко А.Л., Александрова К.В. (ред.). Біохімія: підручник. Харків: Форт, 2014. – 728 с.

Іванченко Д.Г. Біохімічні основи ензимології та вітамінології: навчальний посібник. Запоріжжя: ЗДМФУ, 2025.

Іванченко, Д. Г., Швець, В. М., Федотов, Є. Р., & Михальченко, Є. К. (2025). Біохімія. Біохімічні основи ензимології та вітамінології: навч. пос.

Кононський О.І. Біохімія тварин: Підручник. Київ: Вища школа., 2006. – 454 с.

Лисиця А.В. Біохімія. Практикум: навчальний посібник. Суми: Університетська книга, 2019. – 240 с.

Наконечна О.А., Бачинський Р.О. Біохімія ферментів. Аспекти медичної ензимології: навч.-метод. посібник. Харків, 2020. – 48 с.

Нельсон Д.Л., Кокс М.М. Основи біохімії за Ленінджером: підручник (укр. переклад). Львів: БаК, 2015. – 1256 с.

Остапченко Л.І., Компанець І.В., Скопенко О.В., та ін. Біохімія: практикум: навчальний посібник. Київ: ВПЦ «Київський університет», 2017. – 176 с.

Сибірна Н.О. (ред.). Функціональна біохімія: підручник. Львів: ЛНУ ім. І. Франка, 2018. – 644 с.

Хімічна ензимологія: навчальні матеріали курсу (PhD). Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка, 2023.

Цехмістренко С.І., Кононський О.І., Цехмістренко О.С. Біохімія тварин з основами фізичної і колоїдної хімії. Практикум: Навч. посіб. Біла Церква, 2011. – 216 с.

Явоненко О.Ф. Біохімія: підручник для студентів педагогічних університетів. Суми: Університетська книга, 2018. – 380 с.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.

Cornish-Bowden, A. (2012). *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (4th ed.). Wiley-Blackwell.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th ed.). W. H. Freeman.

## ЗМІСТ

|  |    |
|--|----|
| ВСТУП.....   | 3  |
| 1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА .....  | 5  |
| 1.1. Біохімічні основи біосинтезу ферментів і біологічно активних речовин .....                    | 5  |
| 1.2. Субстрати та джерела одержання ферментних препаратів.....                                     | 7  |
| 1.3. Біотехнологічні методи культивування продуцентів .....  | 10 |
| 1.4. Виділення, очищення та концентрування ферментів і БАР.....                                    | 13 |
| 1.5. Методи дослідження активності ферментів і БАР.....  | 16 |
| 2. ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА .....   | 20 |
| 2.1. Визначення активності ферментів і БАР .....   | 20 |
| 2.1.1. Визначення активності амілази (DNS-метод) .....   | 20 |
| 2.1.2. Визначення активності протеази (казеїновий метод) .....                                     | 20 |
| 2.1.3. Визначення активності ліпази.....   | 21 |
| 2.1.4. Визначення активності фосфатази .....   | 21 |
| 2.1.5. Визначення антиоксидантної активності.....  | 21 |
| 2.2. Визначення оптимальних умов дії ферментів .....   | 22 |
| 2.2.1. Визначення оптимального рН дії $\alpha$ -амілази .....                                      | 22 |
| 2.2.2. Визначення оптимальної температури дії лужної фосфатази .....                               | 23 |
| 2.2.3. Визначення термостабільності протеази (трипсину).....                                       | 24 |
| 2.2.4. Вплив активаторів та інгібіторів на активність $\alpha$ -амілази ...                        | 24 |
| 2.3. Виділення ферментів із мікробної біомаси.....   | 25 |
| 2.3.1. Виділення ферментів: одержання сирого екстракту з мікробної біомаси (центрифугування) ..... | 25 |
| 2.3.2. Руїнування клітин ультразвуком (дезінтеграція) .....  | 26 |
| 2.3.3. Діаліз сирого екстракту (знесолення/обмін буфера).....                                      | 26 |
| 2.4. Імобілізація ферментів та побудова калібрувальних кривих ..                                   | 26 |
| 2.4.1. Ентрапія ферменту в альгінатні гранули .....  | 26 |
| 2.4.2. Ковалентна імобілізація на альдегід-активованому носії (на прикладі лужної фосфатази).....  | 27 |
| 2.4.3. Калібрувальна крива глюкози для DNS-методу (A540).....                                      | 28 |
| 2.4.4. Калібрувальна крива <i>p</i> -нітрофенолу для тестів <i>pNPP/pNPPal</i> .....               | 28 |
| 2.4.5. Калібрувальна крива білка за Бредфордом (A595) .....  | 28 |
| ФОРМИ ПОТОЧНОГО ТА ПІДСУМКОВОГО КОНТРОЛЮ .....   | 29 |
| КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАВЧАННЯ .....   | 29 |
| САМОСТІЙНА РОБОТА СТУДЕНТІВ .....  | 29 |
| РЕКОМЕНДОВАНА ТЕМАТИКА САМОСТІЙНИХ РОБІТ .....   | 30 |
| ЗАПИТАННЯ ТА ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ .....   | 30 |
| ТЕСТОВІ ЗАПИТАННЯ З ДИСЦИПЛІНИ «БІОХІМІЯ» .....  | 32 |
| РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....  | 35 |

## **ДЛЯ ЗАМІТОК**

*Навчальне видання*

**БІОХІМІЯ ОДЕРЖАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕРМЕНТНИХ  
ПРЕПАРАТІВ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

*Методичні рекомендації до виконання практичних робіт та  
самостійної роботи здобувачами першого (бакалаврського) рівня  
вищої освіти спеціальності G21 «Біотехнології та біоінженерія»*

**Цехмістренко** Світлана Іванівна  
**Цехмістренко** Оксана Сергіївна  
**Поліщук** Віталій Миколайович  
**Поліщук** Світлана Анатоліївна  
**Роль** Наталія Валеріївна  
**Гаяк** Надія Володимирівна

Редактор: С.І. Цехмістренко  
Набір: С.І. Цехмістренко