

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**«Санкт-Петербургский государственный университет
промышленных технологий и дизайна»
Высшая школа технологии и энергетики
Кафедра физической и коллоидной химии**

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ПЕРЕРАБОТКИ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ
Выполнение лабораторных работ**

Методические указания для студентов всех форм обучения
по направлению подготовки:
18.04.01 — Химическая технология

Составители:
Е. Ю. Демьянцева
Р. А. Смит

Санкт-Петербург
2021

Утверждено
на заседании кафедры ФиКХ
28.04.2021 г., протокол №10

Рецензент А. Н. Евдокимов

Методические указания соответствуют программам и учебным планам дисциплины «Теоретические основы переработки природных полимеров» для студентов, обучающихся по направлению подготовки 18.04.01 «Химическая технология». Указания содержат описание лабораторных работ, необходимых при изучении курса «Теоретические основы переработки природных полимеров», а также примеры оформления полученных результатов.

Методические указания предназначены для магистров очной формы обучения.

Утверждено Редакционно-издательским советом ВШТЭ СПбГУПТД в качестве методических указаний.

Режим доступа: http://publish.sutd.ru/tp_get_file.php?id=202016, по паролю.
- Загл. с экрана.

Дата подписания к использованию 30.09.2021 г. Рег.№ 59/21

Высшая школа технологии и энергетики СПб ГУПТД
198095, СПб., ул. Ивана Черных, 4.

Содержание

Введение	4
Техника безопасности при работе в лаборатории	5
Лабораторная работа №1	10
Лабораторная работа №2.....	14
Лабораторная работа №3.....	28
Лабораторная работа № 4.....	31
Лабораторная работа № 5.....	36
Лабораторная работа №6.....	41
Библиографический список:	46

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Теоретические основы переработки природных полимеров» является дисциплиной блока Б1 вариативной части учебного плана основной профессиональной образовательной программы высшего образования уровня магистратуры.

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование элементов следующих профессиональных компетенций (ПК) в соответствии с ФГОС ВО по данному направлению:

ПК-5 – способен разрабатывать новые методы лабораторных испытаний полимерных материалов.

В рамках данной компетенции студент должен:

- знать: современные тенденции в области получения и переработки природных полимеров;
- уметь: пользоваться учебной, справочной и специализированной литературой в области технологии получения, применения и переработки природных полимеров ;
- владеть: навыками разработки и усовершенствования лабораторного анализа различных природных полимеров.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

1. Во время работы в лаборатории необходимо надевать халат из хлопчатобумажной ткани.
2. При выполнении работ, связанных с выделением ядовитых газов и пыли, для защиты органов дыхания применяют респираторы, противогазы или другие средства защиты.
3. Для защиты рук от действия кислот, щелочей, солей, растворителей применяют резиновые перчатки.
4. Работы с едкими и ядовитыми веществами, а также с органическими растворителями проводятся только в вытяжных шкафах.
5. Запрещается эксплуатировать неисправные лабораторные и нагревательные приборы. О неисправностях следует сообщить лаборанту или преподавателю.
6. Запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения и одному работать в лаборатории.
7. Не разрешается работать в лаборатории в отсутствие лаборанта или преподавателя.
8. Избегайте лишних движений и разговоров в лаборатории.
9. Избегайте непосредственных контактов кожи, глаз и дыхательных путей с химикатами. На занятиях постоянно носите лабораторный халат. Кроме того, если у вас длинные волосы, их следует аккуратно прибрать, чтобы они не могли соприкасаться с нагревательными приборами, реактивами и т.д.
10. Все работы с ядовитыми и сильнопахнущими веществами, с концентрированными растворами кислот, щелочей, а также упаривание их растворов следует проводить только в вытяжном шкафу. Створки шкафа во время работы должны быть опущены до 18-20 см от его рабочей поверхности.
11. Измельчение твердых веществ, дающих едкую пыль (щелочей, извести, йода и др.), разбавление концентрированных кислот и щелочей, приго-

товление хромовой смеси и т.п. нужно проводить в фарфоровой посуде также в вытяжном шкафу, защитив глаза очками, а руки — перчатками. Разбавляя концентрированные кислоты, особенно серную, осторожно вливают кислоту в воду.

12. С легковоспламеняющимися жидкостями нельзя работать вблизи нагревательных приборов. Запрещается нагревать летучие легковоспламеняющиеся жидкости, вещества (эфир, бензин, спирты, ацетон и т.д.) на открытом пламени. Для этого необходимо использовать водяную или масляную баню.
13. Знакомясь с запахом вещества, нельзя наклоняться над сосудом с жидкостью и вдыхать полной грудью. Для этого нужно направить рукой струю воздуха от отверстия сосуда к себе и сделать носом легкий вдох.
14. Запрещается набирать ртом при помощи пипетки или трубки любые вещества. Для этого следует пользоваться сифоном или резиновой грушей.
15. Особенно внимательно нужно проводить сборку установок из стекла. При этом нельзя зажимать стеклянные изделия в лапки штативов без соответствующей мягкой прокладки. Особенно осторожно обращайтесь с тонкостенной посудой, термометрами и холодильниками.
16. Нельзя нагревать закупоренные любые аппараты и сосуды, кроме тех, которые специально для этого предназначены. Нельзя нагревать жидкости в толстостенной и мерной посуде (она может лопнуть).
17. При приливании реактивов нельзя наклоняться над отверстием сосуда во избежание попадания брызг на лицо и одежду. При использовании пробиркодержателя необходимо зажимать пробирку ближе к открытому концу. Нельзя также наклоняться над нагреваемой жидкостью, так как ее может выбросить. Никогда не направляйте открытый конец пробирки к себе или в сторону вашего соседа.
18. Запрещается производить в лаборатории действия, не связанные непосредственно с выполнением задания.

19. Приступайте к каждой работе только с разрешения руководителя и после полного уяснения всех ее операций.
20. Перед началом работы с прибором его необходимо осмотреть и убедиться в исправности. При наличии мешалки проверить ее работу. Внутреннее пространство любого прибора, не предназначенного для работы под давлением или под вакуумом, во избежание взрыва всегда должно иметь сообщение с атмосферой.
21. Необходимо всегда содержать рабочее место в чистоте и порядке. Взятую посуду, приборы и реактивы следует вернуть на свои места.
22. Запрещается пить, принимать пищу и курить в лаборатории.
23. Студенту, заметившему пожар, необходимо сообщить о возгорании преподавателю или лаборанту.
24. Во всех лабораториях должны быть противопожарные асбестовые одеяла, ящики с песком, совок, углекислотные огнетушители вместимостью 2,5 и 8 л (ОУ-2, ОУ-5, ОУ-8). В случае возникновения пожара надо прежде всего погасить горелки, выключить газ и плитки, унести находящиеся поблизости горючие вещества, а затем тушить пламя углекислотным огнетушителем, песком или использовать противопожарное асбестовое одеяло. Песок применяют при загорании небольших количеств веществ.
25. Углекислотные огнетушители используются при больших очагах пожара, а также для тушения электропроводки и электроустановок. Воду нельзя применять для тушения горящих жидкостей, не смешивающихся с водой. Будучи легче воды, они образуют на ее поверхности тонкую пленку, что приводит к распространению и усилению пожара. Водой нельзя тушить электропроводку и электроустановки, находящиеся под напряжением.
26. Если загорелась одежда, то на пострадавшего следует набросить противопожарное асбестовое одеяло. Пострадавший должен броситься на пол и, перекатываясь по полу, гасить горящую одежду. Пострадавшему нельзя давать бежать.

27. Прежде чем приступать к работе в лаборатории, студент должен сдать экзамен по технике безопасности и противопожарным мероприятиям.
28. Уходя из лаборатории, проверьте, выключены ли газ, вода и электричество на вашем рабочем месте.

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

1. Каждому студенту, работающему в лаборатории, предоставляется место, которое он должен содержать в порядке и чистоте. При выполнении работы не загромождайте рабочее место лишними предметами.
2. Перед занятиями студенту необходимо заранее ознакомиться с ходом проведения опытов по учебному пособию, отчетливо уяснить цели и задачи работы, обдумывая каждое действие. Приступать к выполнению опытов можно только после того, как студент сдаст предварительный отчет (название, краткое описание хода опыта, реакции) и пройдет собеседование. Допуск к работе в виде росписи ведущего преподавателя отмечается в рабочем журнале студента.
3. Работающий должен знать основные свойства используемых и получаемых веществ, их действие на организм, правила работы с ними и на основе этого принять все меры для безопасности проведения работ.
4. Запрещено проводить опыты в грязной посуде, а также пользоваться для проведения опытов веществами из склянок без этикеток или с неразборчивой надписью.
5. Нельзя выливать избыток реактива из пробирки обратно в реактивную склянку. Сухие соли набирают чистым шпателем или ложечкой.
6. Не следует путать пробки от разных склянок. Чтобы внутренняя сторона пробки оставалась чистой, пробку кладут на стол внешней поверхностью.
7. Нельзя уносить реактивы общего пользования на свое рабочее место.
8. После опытов остатки металлов в раковину не выбрасывают, а собирают в банку. Дорогостоящие реактивы (например, остатки солей серебра)

собирают в специально отведенную посуду. Нельзя выливать в раковину остатки растворителей, горючих веществ, реакционные смеси, растворы кислот, щелочей и других вредных веществ. Они должны собираться в специальную посуду («слив органики»).

9. Запрещено засорять раковины и сливы в шкафах песком, бумагой, битой посудой и другими твердыми отходами, что приводит к выходу канализации из строя. Все твердые отходы следует выбрасывать в урну.
10. При выполнении работ бережно расходуйте реактивы, электричество и воду. Нельзя оставлять без надобности включенные электроприборы. По окончании работ нужно немедленно отключить электроприборы и погасить спиртовки.
11. Выполнение лабораторной работы и каждого отдельного опыта требует строгого соблюдения всех указаний, содержащихся в описании работы. Опыт должен исполняться тщательно, аккуратно и без спешки.
12. Студентам категорически запрещается без разрешения преподавателя проводить какие-либо опыты, не относящиеся к данной работе, или изменять порядок проведения опыта. Следует помнить, что каждый, даже кажущийся внешне простым опыт может оказаться при необдуманном выполнении опасным.
13. Если работа не может быть закончена в течение одного занятия, то необходимо заранее обсудить с преподавателем, на каком этапе работа должна быть прервана и когда можно будет ее закончить.
14. Перед уходом из лаборатории рекомендуется тщательно мыть руки.

Лабораторная работа №1

СОВРЕМЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИАМИНОСАХАРИДА — ХИТИНА

Цель: Ознакомиться со способами получения, направлениями применения и свойствами хитина

Задание:

1. Ознакомиться со способами получения полиаминосахарида хитина
2. Получить полиаминосахарид хитин из панцирей ракообразных
3. Ознакомиться с направлениями использования хитина.
4. Сделать вывод о влиянии вида хитинсодержащего сырья на выход хитина.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Хитин ($C_8H_{13}NO_5$)_n (фр. chitine, от др.-греч. χιτών: хитон — одежда, кожа, оболочка) — природное соединение из группы азотсодержащих полисахаридов. Химическое название: поли-N-ацетилD-глюкозо-2-амин, полимер из остатков N-ацетилглюкозамина, связанных между собой β-(1,4)-гликозидными связями (рис. 1).

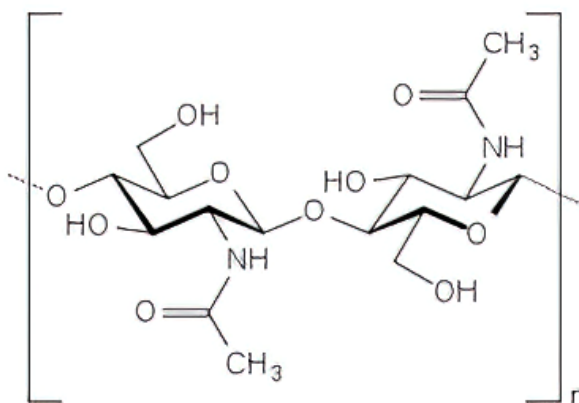


Рисунок 1. фрагмент молекулы хитина

Хитин — один из наиболее распространённых в природе полисахаридов — каждый год на Земле в живых организмах образуется и разлагается около 10 гига-тонн хитина.

Во всех организмах, вырабатывающих и использующих хитин, он находится не в чистом виде, а в комплексе с другими полисахаридами, и очень часто ассоциирован с белками. Несмотря на то, что хитин является веществом, очень близким по строению, физико-химическим свойствам и биологической роли к целлюлозе, в организмах, образующих целлюлозу (растения, некоторые бактерии) хитин найти не удалось.

В естественном виде хитины разных организмов несколько отличаются друг от друга по составу и свойствам. Молекулярная масса хитина достигает 260 000. Хитин отличается низкой химической активностью, т.к. в его молекуле имеются только гидроксильные группы, способные участвовать в химических превращениях. Хитин нерастворим в воде, устойчив к разбавленным кислотам, щелочам, спирту и др. органическим растворителям. Растворим в концентрированных растворах некоторых солей (хлорид цинка, тиоцианат лития, соли кальция) и в ионных жидкостях. При нагревании с концентрированными растворами минеральных кислот разрушается (гидролизует). К хитинсодержащему сырью (ХСС) относятся панцири промысловых ракообразных, мелкие рачки, подмор пчел, куколки тутового шелкопряда и др. ХСС, как правило, представляет собой вторичное сырье. Поскольку образуется при переработке организмов, продуцирующих хитин, на другие солевые продукты. ХСС подвержено быстрому разложению и нуждается в консервировании (замораживание, сушка, слабыми растворами щелочей). Выбеление хитина из панцирей ракообразных состоит из двух стадий: удаление белков и других азотистых соединений (депротеинизация), и удаление минеральных веществ (деминерализация). Эти стадии можно проводить в обратном порядке, однократно или многократно, с использованием растворов кислот и щелочей разных концентраций (от 2 до 50%), растворов солей и ферментов. Хитин, как правило, слегка окрашен в розовые или кремовые тона. Пигменты, обуславливающие эту окраску, могут быть удалены с помощью реактивов, включающих этанол, раствор гипохлорита натрия, хлороформ, пероксид водорода и др. Выход хитина зависит от вида сырья. Например, из панцирей крабов он составляет 25 — 28 %, из криля — 4,6 %. Хитин представляет собой

биологически активный сорбент, который способен извлекать из растворов токсина — холестерин, мочевины, кренин, серотонин, истамин, что важно при лечении патологических расстройств острого и хронического характера. Хитин можно рассматривать как коммерческий продукт и как промежуточный продукт в технологии хитозана. Качество хитина как готового продукта оценивают по цвету, запаху, гранулометрическому составу, химическим показателям, которые должны соответствовать требованиям ТУ.

ОБЪЕКТЫ, ПРИБОРЫ, РЕАКТИВЫ

Объекты исследования: панцири ракообразных (краб, креветка) сушеные по 30 — 50 г. Приборы и реактивы: весы лабораторные; шкаф сушильный; цилиндр мерный, v 100 см³ — 3 шт.; Чашки фарфоровые — 3 шт.; Емкость стеклянная, v 1 л — 9 шт.; Мешалка магнитная — 3 шт: фильтровальная бумага; индикатор универсальный; 3,6%-ный раствор соляной кислоты; 4%-ный раствор гидроксида натрия (NaOH); 10%-ный раствор гидроксида натрия (NaOH).

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Работа рассчитана на 6 часов и выполняется группами студентов по 2 — 3 человека.

ХОД РАБОТЫ

Работа выполняется двумя группами студентов. Одна группа получает хитин из панцирей крабов, вторая — из панцирей креветок. Сухое хитиносодержащее сырье с целью деминерализации заливают 3 — 4% -ным раствором HCl в соотношении 1 : 6. Смесь выдерживают при непрерывном перемешивании в течение 1 — 1,5 ч при температуре окружающей среды. Кислоту сливают, панцири ракообразных промывают проточной водой до нейтральной pH промывных вод (pH измеряют при помощи лакмуса). Далее производят депротеинизацию. Для этого промытые панцири ракообразных заливают 4 — 5%-ным раствором NaOH в соотношении 1 : 6. Смесь выдерживают при перемешивании

в течение 1 — 1,5 ч при температуре 70 — 80 °С. Далее производят промывку. При необходимости производят повторную деминерализацию и депротеинизацию. Полученный хитин высушивают в сушильном шкафу при температуре не выше 60 °С. Рассчитать выход полученного хитина к массе направленного на обработку сырья.

Полученные данные внести в таблицу.

Таблица — Выход хитина

Наименование сырья	Выход, %
Панцири краба сушеные	
Панцири креветок сушеные	

На основании полученных результатов, обмениваясь результатами, различающимися по вариантам, студенты делают выводы.

Лабораторные работы по определению активности ферментов

Лабораторная работа №2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (АС). КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ПО ГОСТ 20264,4-74

Цель: ознакомиться с методами определения амилалитической активности ферментов.

Задание: определить амилалитическую активность ферментов при разных условиях.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Ферменты (от лат. *fermentum* — закваска, брожение), или энзимы (от греч. *enzyme* — в дрожжах), являются веществами белковой природы, которые используются живыми организмами для катализа многих химических реакций. Все ферменты (в настоящее время их более 3000) были разделены международной комиссией по ферментам в 1976 г. на различные классы (оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы) в соответствии с теми химическими реакциями, которые они катализируют. Каждый класс состоит из подкласса, уточняющего природу субстрата, кофермента или характер превращения.

В целлюлозно-бумажной промышленности (ЦБП) в настоящее время получили применение некоторые ферменты, такие как: α -амилаза (модифицирует крахмал для обёрточной бумаги), целлюлаза (для удаления чернил с поверхности бумаги), ксиланаза (используется при предварительной обработке перед стадией отбеливания, позволяет существенно сократить расходы хлоросодержащих химикатов), гемицеллюлаза (также применяется в качестве реагента для «биоотбеливания»), липаза (уменьшает отложения липких компонентов древесины на оборудовании, способствует удалению офсетной краски). Перспективными ферментами для применения в ЦБП являются эндоцеллюлазы (для улучшения характеристики древесных волокон) и оксиредуктазы (для усиления действия отбеливающих агентов, действующих вместе с кислородом или перекисью водорода).

Источником фермента может служить любой живой объект. Поэтому ферменты могут быть как растительного, так и животного происхождения. В настоящее время для получения ферментов и ферментных препаратов используют микроскопические грибы, бактерии и дрожжи. Так, например, на данный момент выделены липазы из 34 различных источников, из которых 18 видов — из плесневых грибов и 7 — из бактерий.

Механизм ферментативного катализа

Ферменты являются замечательными катализаторами, осуществляющими с большой скоростью и 100%-м выходом такие химические реакции, которые трудно провести в лаборатории.

Главной особенностью ферментативной реакции является то, что она протекает в составе активного комплекса, образованного в результате связывания субстрата с определённым участком молекулы фермента (активным центром или центром связывания), к которому субстрат обладает специфическим сродством. Это взаимодействие обычно стабилизируется образованием ряда связей между группировками молекулы субстрата и определённым образом расположенными группами фермента. Взаимодействие между ферментом и субстратом может осуществляться с помощью ковалентных и водородных связей, электростатических и гидрофобных сил и т.д. Активный центр является, следовательно, весьма сложной структурой, которая может составлять существенную часть молекулы фермента; часто он имеет форму щели, в которой размещается субстрат. Поскольку фрагменты субстрата связываются с конкретными участками активного центра фермента, субстрат фиксируется на ферменте, принимая определенную конфигурацию.

Конечно, в реакции могут участвовать разные субстраты; они специфически связываются с расположенными поблизости участками активного центра и удерживаются в такой взаимной ориентации, которая наиболее благоприятна для их взаимодействия друг с другом.

Связывание субстрата с активным центром фермента должно быть достаточно легко обратимым, в противном случае активный центр окажется заблокированным первой же присоединившейся молекулой субстрата, и каталитический

цикл не сможет осуществиться. Поэтому, несмотря на значительные различия в эффективности фермент-субстратных взаимодействий в различных системах, связывание между группами фермента и соответствующими группами субстрата должно быть довольно слабым. В то же время наличие большого числа одновременно взаимодействующих групп обеспечивает достаточно высокое сродство. Для этого различные группы фермента должны быть расположены надлежащим образом, чтобы связывание их с группами субстрата могло осуществляться одновременно. Это является основой специфичности фермента, соответствия между ферментом и субстратом по типу «замок-ключ».

Можно легко показать, что реакции, катализируемые подавляющим большинством ферментов, обратимы, т.е. данный фермент катализирует реакцию в обоих направлениях. Отсюда следует, что активный центр фермента может специфически связывать как субстрат, так и продукт; связанный реактант активируется и оказывается способным к соответствующему превращению. Молекулы субстрата и продукта несколько различаются по форме, и напрашивается вывод, что при превращении одного в другой образуется соединение, имеющее «промежуточную» форму. Весьма заманчиво предположить, что активный центр фермента комплементарен именно этому интермедиату. Активный центр не может одновременно точно соответствовать и субстрату, и продукту, без некоторого изменения своей структуры; при взаимодействии с активным центром субстрат или продукт приближаются по своей конформации к интермедиату и, таким образом, активируются для определенной трансформации. Чтобы различные группы субстрата (или продукта), участвующие в связывании, могли взаимодействовать с соответствующими группами фермента, должно произойти некоторое изменение как субстрата, так и фермента; масштаб этих изменений зависит от жёсткости химических структур молекул фермента и субстрата. В изменении конформации активного центра, в который входят группировки из различных участков пептидной цепи, сближенные благодаря ее характерной укладке, определённую роль играет гибкость всей белковой молекулы. Для современных представлений о химических аспектах ферментативных реакций характерна четко выражен-

ная тенденция опираться на химические свойства самого субстрата. Это вполне естественно: несмотря на всю сложность, в действии ферментов нет ничего таинственного, и в основе ферментативных реакций, несомненно, лежат обычные химические процессы. При этом следует понимать, что по существу речь идёт о свойствах не свободного субстрата, а совершенно другого соединения — фермент-субстратного комплекса, который может обладать новыми свойствами. В составе комплекса группы субстрата взаимодействуют с определёнными группами фермента, конформация субстрата в комплексе может отличаться от той, которую он имеет в свободном состоянии в растворе, и в нём могут возникать внутренние напряжения.

Механизмы химического и ферментативного катализа сходны. Доминирующей концепцией в современной науке является теория переходного состояния. Данная теория рассматривает два состояния реагентов — исходное (основное) и переходную структуру, наименее стабильную, которой соответствует максимум энергии. Для вещества, находящегося в переходном состоянии, существует равная вероятность того, что достигшие его молекулы вступят в реакцию с образованием продукта реакции или вернутся обратно на уровень не прореагировавших молекул. Скорость любой химической реакции пропорциональна концентрации молекул, находящихся в переходном состоянии. Но переходного состояния может достичь только та часть молекул исходного вещества, которая обладает достаточной энергией для преодоления энергетического барьера.

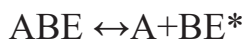
Основная функция любого катализатора, в том числе фермента, — снижение энергетического барьера реакции. Катализатор ускоряет химическую реакцию, находя «обходные пути», позволяющие молекулам преодолевать активационный барьер на более низком энергетическом уровне. Согласно современным представлениям, снижение энергии активации достигается через образование фермент-субстратного комплекса, переходному состоянию которого соответствует более низкая энергия активации. Таким образом, в присутствии катализатора (фермента), значительная часть молекул данного субстрата вступает в реакцию в единицу времени.

Условно ферментативный процесс можно подразделить на 3 стадии:

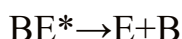
1. Стерическое связывание субстрата с активным центром — образование фермент-субстратного комплекса (на примере реакции $AB \rightarrow A+B$):



2. Преобразование первичного фермент-субстратного комплекса в активированный переходный комплекс:



3. Отделение конечного продукта от фермента:



Вторая стадия более медленная и лимитирует скорость всей химической реакции, она является собственно актом катализа, т.е. разрыва и образования новых связей. На этой стадии и происходит снижение энергии активации.

Свойства ферментов как биологических катализаторов

Ферменты, являясь катализаторами белковой природы, имеют некоторые сходства с небиологическими катализаторами:

1. Энзимы не входят в состав конечных продуктов реакции.
2. Такого рода катализаторы не смещают положения равновесия.
3. Ферменты не могут возбудить реакции, протекание которых противоречит законам термодинамики, они ускоряют только те реакции, которые могут протекать и без них.

Однако также имеются и некоторые специфические свойства:

1. По своей природе ферменты являются белками.
2. Ферменты обладают узкой специфичностью (избирательностью действия на субстраты). Биологическая функция фермента, как и любого белка, обусловлена наличием в его структуре активного центра, с которым взаимодействует определенный лиганд. Лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента, называется субстратом.
3. Большинство катализируемых ферментами реакций высокоэффективны, они протекают в 10^8 – 10^{14} раз быстрее, чем некатализируемые реакции. Каждая молекула фермента способна за секунду трансформировать от 100 до 1000 молекул субстрата в продукт.

4. Конформационная лабильность. Каталитическая эффективность фермента, как и любой белковой молекулы, зависит от его конформации и, в частности, от конформации активного центра. В клетках имеются вещества, которые могут вызывать незначительные изменения конформации молекулы фермента за счет разрыва одних и образования других слабых связей; это может вызывать как повышение, так и снижение активности фермента.
5. Активность ферментов может регулироваться. Действие ферментов в клетке, как правило, строго упорядочено: продукт одной ферментативной реакции является субстратом другой; таким образом образуются метаболические пути. Среди множества ферментов практически каждого метаболического пути имеются ключевые, или регуляторные, ферменты, активность которых может изменяться в зависимости от потребности клетки в конечном продукте метаболического пути.
6. Оптимальные условия протекания ферментативных реакций: температура 37–38 °С; нормальное атмосферное давление, рН 6,9–7,7, характерное для большинства тканей.

Ферментативная активность

Для измерения каталитической активности ферментов используют такие показатели, как скорость реакции или активность фермента. *Скорость ферментативной реакции* определяется уменьшением количества молекул субстрата или увеличением количества молекул продукта за единицу времени. Скорость ферментативной реакции является мерой каталитической активности фермента и обозначается как *активность фермента*.

Для определения ферментативной активности прежде всего следует тщательно продумать метод, которым следует воспользоваться, поскольку ферментативная активность зависит от многих факторов: температура, рН среды, концентрации субстрата и кофакторов.

Так, например, для большинства известных в настоящее время ферментов определён оптимум рН, при котором они обладают максимальной активностью.

Эта величина — важный критерий, служащий для характеристик фермента. Иногда это свойство ферментов используют для их препаративного разделения. Наличие оптимума рН можно объяснить тем, что ферменты представляют собой полиэлектролиты и их заряд зависит от значения рН. Иногда сопутствующие вещества могут изменить оптимум рН, например буферные растворы. В некоторых случаях в зависимости от субстратов ферменты с неярко выраженной специфичностью имеют несколько оптимумов. Например, пепсин расщепляет белки яйца при рН 1,5–2,0, синтетические субстраты — при рН 4,0. Отсюда следует, что величина (рН оптимум) — весьма чувствительный признак для данного фермента. Она зависит от природы субстрата, состава буферного раствора и поэтому не является истинной константой. Нужно иметь в виду также свойства ферментов как белковых тел, способных к кислотно-щелочной денатурации. Кислотно-щелочная денатурация может привести к необратимым изменениям структуры фермента с утратой его каталитических свойств.

Температура — один из важнейших факторов внешней среды, который независимо от состояния равновесия реакции меняет её скорость. Поэтому при ферментативных реакциях при повышении температуры на 100 °С процесс ускоряется в 1,5–2 раза. При дальнейшем повышении температуры присоединяются денатурационные процессы, характерные для всех белков и в том числе для ферментов, поэтому наблюдается затухание скорости реакции. Температурным оптимумом реакции называют температуру, при которой одно её действие вызывает ускорение реакции, катализируемой данным ферментом. Для большинства ферментов животного происхождения он равен 400–500 °С, для ферментов растительного происхождения он равен 500–600 °С. Почти все ферменты разрушаются при температуре 800 °С. Но для некоторых ферментов в настоящее время доказана возможность восстановления их каталитической активности в случае обратимого процесса денатурации белка.

Скорость любого ферментативного процесса в значительной степени зависит от концентрации как субстрата, так и фермента. Обычно скорость реакции прямо пропорциональна количеству фермента, при условии, если содержание

субстрата в пределах оптимума или немного выше. При постоянном количестве фермента скорость возрастает с увеличением концентрации субстрата. Эта реакция подчинена закону действующих масс.

Учитывая эти и другие факторы, при определении активности ферментов следует строго соблюдать постоянство условий проведения опыта. Также является целесообразным не ограничиваться одним способом определения.

О скорости ферментативной реакции судят или по скорости убыли субстрата, или по скорости образования субстрата. Количество субстрата, превращаемого в условиях испытания, должно быть пропорционально количеству фермента и времени инкубирования. Если же нет такой пропорциональности, то активность рассчитывают по предварительно построенному калибровочному графику, отражающему зависимость скорости реакции от количества единиц фермента. Когда ход реакции не линеен во времени, следует определять начальную скорость реакции (по тангенсу угла наклона касательной к начальному отрезку кривой превращения).

Способы выражения активности энзимов

Для выражения концентрации фермента и количественной оценки его активности в условных единицах Комиссией по ферментам Международного биохимического союза была рекомендована стандартная международная единица (Е или U): за единицу активности любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образование 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин) при оптимальных условиях (температура 37°C, оптимальное значение рН раствора) проведения ферментативной реакции. Эти единицы активности используют в медицинской и фармацевтической практике для оценки активности ферментов:

$$1 \text{ E} = 1 \text{ мкмоль превращенного субстрата за 1 мин.}$$

Например, если при инкубации 0,5 мл экстракта дрожжей с раствором аргинина за 15 мин разложилось 120 мкмоль аргинина, это означает, что в 0,5 мл экстракта содержится 120/15, т.е. 8 Е фермента аргиназы. Эта величина отражает *общую активность аргиназы*, содержащейся в 0,5 мл экстракта. Концентрацию

фермента выражают в единицах на 1 мл (Е/мл). Если в 0,5 мл экстракта содержится 8 Е аргиназы, это значит, что концентрация фермента равна 8:0,5, т.е. 16 Е/мл.

Для оценки количества молекул фермента среди других белков данной ткани определяют удельную активность (Уд.Ак.) фермента, численно равную количеству превращенного субстрата (в мкмольях) за единицу времени одним миллиграммом (мг) белка (фермента, выделенного из ткани) и по которой судят о степени очистки фермента (чем меньше посторонних белков, тем выше удельная активность.): $\text{Уд.Ак.} = 1 \text{ мкмоль превращенного субстрата } 1 \text{ мин} \times \text{количество белка (мг)} = E \text{ количество белка (мг)}$.

Например, если в 0,5 мл экстракта, содержащего 8 Е аргиназы, обнаружено 20 мг белка, это значит, что удельная аргиназная активность экстракта равна $8:20=0,4 \text{ Е/мг}$.

Для сопоставления каталитической активности разных ферментов определяют молекулярную активность (число оборотов), которая соответствует числу молекул субстрата, превращаемых одной молекулой фермента за 1 мин. Молекулярную активность фермента можно определить лишь в том случае, если известна молекулярная масса фермента и его молекулярная концентрация в растворе — эти данные возможны только для ферментов, полученных в чистом (гомогенном состоянии).

В связи с решением XXI Генеральной конференции по мерам и весам предложено новое выражение активности фермента в каталах (кат, kat): 1 кат есть каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 моль субстрата в 1 с (1 моль/с). Отношение международной единицы (Е) к каталу можно выразить следующим образом: $1 \text{ кат} = 1 \text{ моль} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ моль} \cdot \text{мин}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ Е}$, или: $1 \text{ Е} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} = (1/60) \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} = (1/60) \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}$. Таким образом, 1 Е фермента соответствует 16,67 нкат.

Амилолитические ферменты

Амилолитические ферменты принадлежат к классу гидролаз, ко второму их подклассу — гидролазам гликозидов. В целлюлозно-бумажной промышлен-

ности нашёл применение фермент α -амилаза, удаляющий продукты крахмала из вторичных волокон.

Крахмал является гомополимером глюкозы. Он представлен линейной (амилоза) и разветвлённой (амилопектин) разновидностью полимеров. Различные виды крахмала имеют разную температуру клейстеризации (ТК). Интервал этой температуры тем шире, чем разнороднее по размеру крахмальные зёрна. Повышение относительного содержания амилопектина приводит к снижению ТК. В пределах температурной зоны клейстеризации основная масса крахмальных гранул переходит в состояние геля, но часть крахмала, локализованного в центре гранул, остаётся нетронутой. Для полного вскрытия гранул необходимо нагревание при температуре до 120 °С. Частичный гидролиз крахмала ферментами в процессе клейстеризации позволяет снизить температурный предел за счёт облегчённой деградации гранул.

В качестве субстрата при определении активности амилалитических ферментов применяют не нативный, а растворимый крахмал с меньшей молекулярной массой, так как его гидролиз протекает значительно быстрее. Растворимый крахмал получают при слабом воздействии кислот на крахмал при тепловой обработке. В процессе ферментативного гидролиза крахмала образуются низкомолекулярные декстрины и небольшое количество мальтозы.

Группа ферментов, гидролизующих крахмал, включает: α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу, α -глюкозидазу, изоамилазу, пуллуланазу. Все эти ферменты различаются по своим свойствам, распространению в природе и способу воздействия на крахмал. Для расщепления крахмала с образованием циклических продуктов реакции используют фермент циклодекстринглюканотрансферазу, относящуюся к классу трансфераз.

α -Амилаза — (декстрогенамилаза, α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза) гидролизует α -1,4-глюкановые связи в полисахаридах, содержащих три и более остатков D-глюкозы. Это водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина и имеющий молекулярную массу порядка 45-60 КДа. α -Амилаза содержится в культурах плесневых грибов и бактерий, в проросшем зерне пшеницы,

ржи, ячменя т.д. α -Амилаза присутствует в слюне и поджелудочной железе. Её продуцентами являются бактерии *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus macerans*, а также грибы *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* и так далее.

Белок α -амилазы обладает слабокислыми свойствами, изоэлектрическая точка колеблется в пределах pH 4,2-5,7. α -Амилаза является кальций зависимым ферментом и обычно содержит от 1 до 4 атомов кальция. При кислотной или термической инактивации α -амилазы ионы Ca^{2+} оказывают стабилизирующее действие. По термостабильности α -амилазы различаются в зависимости от их происхождения: грибная α -амилаза быстрее разрушается при повышенной температуре, α -амилаза солода более термостабильна, самой термоустойчивой α -амилазой является бактериальная. Однако её общий температурный оптимум около 66°C. Гидролиз крахмала под действием α -амилазы протекает в две стадии: короткая — предстационарная и длительная — стационарная. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя смесь линейных и разветвлённых олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается, пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться йодом, он протекает медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы. Поэтому конечные продукты гидролиза α -амилазами могут быть различными. α -Амилазы катализируют реакцию гидролиза крахмала, в результате которой образуются α -декстрины, мальтоза и глюкоза.

ОБЪЕКТЫ, ПРИБОРЫ, РЕАКТИВЫ

Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

Амилолитическая активность характеризует способность амилолитических ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в одном грамме препарата.

За единицу активности амилолитических ферментов принято такое число, которое в строго определённых условиях температуры, pH и времени действия

катализирует до декстринов различной молекулярной массы 1 г растворимого крахмала, или 30% от введённого в реакцию вещества.

Необходимые реактивы: раствор крахмала 1%; основной раствор йода; рабочий раствор йода.

ХОД РАБОТЫ

Основной раствор йода. 0,5 г металлического йода и 5 г йодида калия помещают в бюкс, добавляют 2 см³ дистиллированной воды и закрывают притёртой крышкой. После полного растворения йода раствор переносят в мерную колбу на 200 см³ с пришлифованной пробкой, и объём жидкости доводят до метки дистиллированной водой. Основной раствор хранят в темноте и используют в течение месяца.

Рабочий раствор йода. 2 см³ основного раствора разводят 0,1 % раствором соляной кислоты в мерную вместимость 100 см³. Перед употреблением проверяют его оптическую плотность на ФЭК, применяя кюветы с рабочей длиной 10 мм и светофильтр с максимумом пропускания при $\lambda=453$ нм (синий). Оптическая плотность рабочего раствора должна быть равна на ФЭК 56-М — $0,220 \pm 0,01$. В случае отклонения от указанной величины ее приводят к необходимой добавлением нескольких капель 0,1 н раствора соляной кислоты и основного раствора йода.

Техника определения. В две пробирки диаметром 2 см и высотой 18 см наливают по 10 см³ 1%-го раствора крахмала и ставят в термостат или водяную баню с температурой $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$ на 5-10 минут.

Затем, не вынимая пробирок из термостата, наливают в первую 5 см³ дистиллированной воды (контрольная), во вторую — 5 см³ ферментного раствора (опытная).

Смеси быстро перемешивают и выдерживают в термостате 10 минут (по секундомеру). Затем из реакционных смесей (контрольного и опытного растворов) отбирают по 0,1 см³ раствора и переносят их в колбы, с 10 см³ рабочего раствора йода.

Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный — синюю, опытный — фиолетовую различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала.

Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре, используя светофильтр с максимумом светопропускания при $\lambda=656$ нм, пользуясь кюветами с толщиной поглощаемого свет слоя 1 см. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода.

Оптическая плотность контрольного раствора D_1 соответствует количеству исходного крахмала субстрата. Оптическая плотность опытного раствора D_2 соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата.

Количество гидролизованного крахмала C (г) определяют по формуле:

$$C = \frac{0,1 \times (D_1 - D_2)}{D_1}, \quad (1)$$

где 0,1 — количество крахмала, взятого на испытание в качестве субстрата, г.

Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,07 г, то испытания повторяют. Для этого при приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления.

Если в результате ферментативной реакции количество превращённого крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчёта амилолитической активности или скорости гидролиза.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Амилолитическую активность AC (ед/мл) препаратов бактериального происхождения определяют по формуле:

$$AC = \frac{(5,885 \times C + 0,001671) \times 1000}{n}, \quad (2)$$

а амилолитическую активность препаратов грибного происхождения — по формуле

$$AC_1 = \frac{(7,264 \times C - 0,03766) \times 100}{n}, \quad (3)$$

где 5,885; 0,001671; 7,624; 0,03766 — коэффициенты расчётного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества гидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания (в коэффициенты введён множитель для пересчёта на 1 час действия фермента); С — количество прогидролизованного крахмала, г; 100; 1000 — коэффициент пересчёта миллиграммов в граммы; n — количество ферментного препарата, взятое для испытания, мг.

Лабораторная работа №3

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОБАВОК НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ АМИЛОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА.

Цель работы: определить термостабильность раствора амилаолитического фермента под влиянием добавок органической и неорганической природы.

Задание: Определить температурный диапазон существования ферментов, обладающих амилазной активностью

ОБЪЕКТЫ, ПРИБОРЫ, РЕАКТИВЫ

Необходимые реактивы: раствор крахмала с концентрацией 1%; ацетатный буферный раствор с рН 4,7; основной раствор йода; рабочий раствор йода; 1% раствор исследуемого препарата фермента.

Приборы и посуда: колбы плоскодонные; пипетки на 0,2 мл, 1 мл, 5 мл и 10 мл; мерный цилиндр; пробирки; кипящая водяная баня; термостат; фотоэлектроколориметр.

ХОД РАБОТЫ:

Приготовление растворов фермента, содержащих добавки. В первую пробирку вносят 10 мл исходного раствора фермента и добавляют 110 мг хлорида кальция и тщательно перемешивают (концентрация хлористого кальция 10^{-1} моль/л). Во вторую пробирку вносят 10 мл исходного раствора фермента и добавляют 50 мг сорбита, тщательно перемешивают содержимое пробирки до полного растворения сорбита (концентрация сорбита — 0,5%). В третью пробирку вносят 10 мл исходного раствора фермента. Сразу же после приготовления из всех полученных образцов отбирают по 1 мл и используют для проведения процесса гидролиза крахмала и определения исходной активности ферментного препарата. Далее пробирки закрывают воздушными холодильниками и ставят в термостат с температурой 65°C на 60 мин; через каждые 15 минут проводят отбор проб (по

1 мл), которые охлаждают до $T=30^{\circ}\text{C}$ и используют для гидролиза крахмала.

Гидролиз крахмала. Готовят 1%-й раствор крахмала и нагревают его до температуры 30°C . Затем 1 мл ферментного препарата, прошедшего тепловую обработку, помещают в чистую пробирку, предварительно добавив в неё 2 мл 1%-го раствора крахмала, нагретого до $T=30^{\circ}\text{C}$. Такую же процедуру повторяют со всеми испытуемыми растворами фермента. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивают и выдерживают в термостате при температуре 30°C в течение 10 минут для прохождения процесса гидролиза. В полученных гидролизатах определяют количество прогидролизованного крахмала и амилолитическую активность. Для этого в колбы вносят по 10 см^3 рабочего раствора йода, затем переносят туда по $0,1\text{ см}^3$ гидролизата. Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный — синюю, опытный — фиолетовую различной интенсивности в зависимости от непрогидролизованного крахмала.

Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре, используя светофильтр с максимумом светопропускания при $\lambda=656\text{ нм}$ (640-690 нм), пользуясь кюветами с толщиной поглощающего свет слоя 1 см. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода.

Оптическая плотность контрольного раствора D_1 соответствует количеству исходного крахмала субстрата. Оптическая плотность опытного раствора D_2 соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата.

Количество гидролизованного крахмала C (г) определяют по формуле:

$$C = \frac{0,1 \times (D_1 - D_2)}{D_1}, \quad (4)$$

где 0,1 — количество крахмала, взятого на испытание в качестве субстрата, г.

Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,07 г, то испытания повторяют. Для этого при приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления.

Если в результате ферментативной реакции количество превращённого крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчёта амилолитической активности или скорости гидролиза.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Амилолитическую активность АС (ед/мл) препаратов бактериального происхождения определяют по формуле:

$$AC = \frac{(5,885 \times C + 0,001671) \times 1000}{n}, \quad (5)$$

где 5,885; 0,001671 — коэффициенты расчётного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества гидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания (в коэффициенты введён множитель для пересчёта на 1 час действия фермента); С — количество прогидролизованного крахмала, г; 1000 — коэффициент пересчёта миллиграммов в граммы; n — количество ферментного препарата, взятое для испытания, мг или мл.

Таблица для записи данных опытов:

Образец	Время тепловой обработки, мин	АС, ед./г	Примечания
Исходный раствор ферментного препарата	0		
	15		
	30		
	45		
	60		
Раствор ферментного препарата с добавкой хлористого кальция	0		
	15		
	30		
	45		
	60		
Раствор ферментного препарата, содержащий сорбит	0		
	15		
	30		
	45		
	60		

По полученным данным построить график зависимости активности ферментного препарата от времени тепловой обработки. Определить, какая из добавок (органической природы или неорганическая) в большей степени способствует сохранению активности ферментного препарата.

Лабораторная работа № 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КСИЛАНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОКРАШЕННОГО СУБСТРАТА

Цель: определить ксиланазную активность фермента.

Задание: Определить ксиланазную активность различных гидролаз.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Ксиланаза представляет собой комплекс ферментов, задействованных в деградации гетерогенного полисахарида — ксилана. Основным является фермент эндо-1,4-ксиланаза, который катализирует распад ксилана до ксилоолигосахаридов. Другие ферменты, такие как ксилозидаза, L-арабинофуразидаза, глюкуронидаза и эстераза (ксиланацетилэстераза и ферилоилэстераза), выполняют полный гидролиз ксилоолигосахаридов до мономеров.

Ксиланазы представляют собой гликопротеины с молекулярной массой 6–80 кДа. Ферменты активны в диапазоне температур 40–60°C и pH 4,5–6,5.

Ксилан является наиболее распространённым представителем гемицеллюлоз растительной биомассы. В связи с этим интерес к этому классу ферментов неуклонно растёт в связи с возможностью их применения в целлюлозно-бумажной промышленности. Ксиланазы продуцируются многими видами бактерий и грибов. Наиболее полно изучены бактериальные ферменты, включающие несколько видов *Bacillus* и актиномицетов, таких как *Thermonospora fasca*, также хорошо изученными источниками ферментов являются грибы *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.* и *Aureobasidium pullulans*. Известно, что микроскопический гриб *Trichoderma viride* 44-11-62/3 является активным продуцентом комплекса целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов, в том числе и ксиланазы.

Явление сорбции гемицеллюлоз (ГЦ) на целлюлозные волокна давно привлекает внимание исследователей. Первые упоминания о нем относятся к 30-ым

годам XX века, когда было замечено, что размол целлюлозы в присутствии ксилана приводил к увеличению содержания его в бумаге на 2–3%. Сорбция ксилана на целлюлозу в процессе сульфатной варки впервые была обнаружена шведскими учеными Ильнером и Энстремом в 1956 году.

При контакте целлюлозы с растворами ГЦ практически всегда происходит их сорбция на целлюлозных волокнах, целлюлоза способна сорбировать ГЦ при высокой и низкой температуре, в процессе варки, отбелки, размола и даже холодного облагораживания. Теоретические аспекты этого явления рассмотрены в работах Меллера, А.П. Трейманиса, В.С. Громова и других. Сорбция имеет важное практическое значение: от количества сорбированных ГЦ зависят выход целлюлозы и показатели ее механической прочности.

Интерес к явлению сорбции ГЦ вновь возник в 80-х годах XX века, когда финскими учеными было установлено, что ферменты ксиланазного типа гидролизуют остаточный ксилан, что способствует более легкому удалению лигнина при отбелке целлюлозы.

Это перспективное направление в технологии отбелки нашло быстрое и широкое промышленное применение. К 2001 году многие заводы в разных странах применяли ксиланазы для уменьшения расхода отбеливающих реагентов и снижения загрязнения окружающей среды. Обработка ферментами успешно используется как в обычных схемах отбелки, так и в схемах без применения элементарного хлора (ECF) или TCF-схемах.

По экономическим соображениям в целлюлозно-бумажной промышленности нашли применение гемицеллюлазные ферменты. Промышленность выпускает два вида гемицеллюлазных ферментов: эндо-1,4-β-D-ксиланазу и эндо-1,4-β-D-манназу, называемых соответственно ксиланазой и маннаназой. Наиболее широкое применение при отбелке целлюлозы нашли ксиланазы. Большинство имеющихся в настоящее время товарных ксиланаз имеют различную молекулярную структуру и по этой причине часто обладают различными свойствами. Характерно, что свойства, которые варьируются у разных ксиланаз, связаны с их стабильностью, числом каталитических циклов на единицу фермента,

определяющим его дозировку, и интервалами значений pH и температуры, требующихся для деятельности фермента.

Промышленные ферменты добавляются к целлюлозной массе в соответствии с их каталитической активностью. Единица активности — это число микромолей редуцирующего сахара (ксилозы), образующееся за 1 минуту, или число молей редуцирующего сахара, образующееся за одну секунду в определенных стандартных условиях. Промышленные ферменты обычно стабильны при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Для сохранения оптимальной активности длительное хранение ферментов необходимо проводить при низких температурах.

Благоприятное влияние ферментов при отбелке зависит от используемой схемы отбелки, содержания остаточного лигнина в целлюлозе, задаваемой конечной белизны и экологических интересов предприятия. Основная цель отбелки целлюлозы с участием ферментов направлена на снижение расхода хлорсодержащих химикатов в процессе отбелки и уменьшения содержания адсорбируемого органического галогена (AOX) в сточных водах.

Ферменты ксиланазного типа катализируют гидролиз ксиланов, не затрагивая при этом целлюлозу (рис. 2).

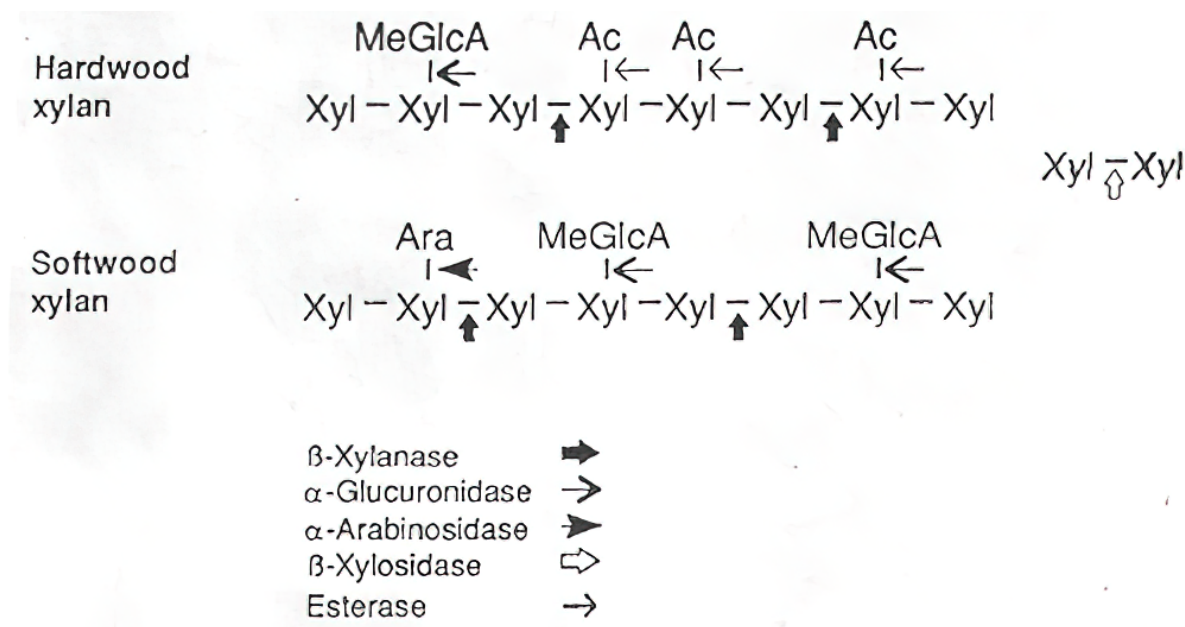


Рис. 2. Механизм действия различных ферментов на ксиланы древесины

Hardwoodxylan — ксилан лиственной древесины;

Softwoodxylan — ксилан хвойной древесины

На действие ферментов влияет доступность субстрата: в нашем случае — матрицы целлюлозного волокна. Факторы, ограничивающие доступ ферментов к местам расположения ксилана — это особенности поверхностной структуры и размер пор волокон. Молекулярный размер и структура фермента также являются важными факторами, от которых зависит способность ферментов проникать во внутренние структуры волокон.

ОБЪЕКТЫ, ПРИБОРЫ, РЕАКТИВЫ

Метод основан на гидролизе окрашенного ксилана раствором ферментного препарата с последующим определением оптической плотности образовавшегося окрашенного растворимого продукта реакции. За единицу ксиланазной активности в данном методе принято такое количество фермента, которое гидролизует 1 мкмоль гликозидных связей ксилана за 1 минуту при 40°C в принятых условиях.

Необходимые реактивы: 0,5%-й раствор окрашенного ксилана; 0,1 М ацетатный буферный раствор с рН 4,5; ферментный раствор.

ХОД РАБОТЫ

В пробирку вместимостью 45 см³ вносят 25 г окрашенного ксилана, приливают 4 см³ 0,1 М ацетатного буферного раствора и в течение 5 минут встряхивают на термостатируемой качалке при температуре 40°C. Затем добавляют 1 см³ исследуемого ферментного раствора и инкубируют, вновь встряхивая 20 минут при той же температуре, после чего реакцию смесь 3 минуты центрифугируют или фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Определяют оптическую плотность прозрачного фильтрата на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при длине световой волны 490 нм в сравнении с контрольным раствором. Последний готовят аналогично опытному, заменяя ферментный раствор 1 см³ 0,1 М ацетатного буферного раствора с рН 4,5.

Раствор ферментного препарата в ацетатном буфере готовят такой концентрации, чтобы после проведения ферментативной реакции и последующего колориметрирования оптическая плотность исследуемого раствора находилась в интервале 0,3–0,8.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Ксиланазную активность (ед/г) рассчитывают по формуле

$$AK = \frac{A \times 1000}{t \times a}, \quad (6)$$

где A — оптическая плотность; 1000 — коэффициент пересчёта на 1 г препарата;
 a — количество ферментного препарата, взятое для анализа; t — продолжительность гидролиза субстрата, мин.

Лабораторная работа № 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ (МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОТА—ЯМАДЫ)

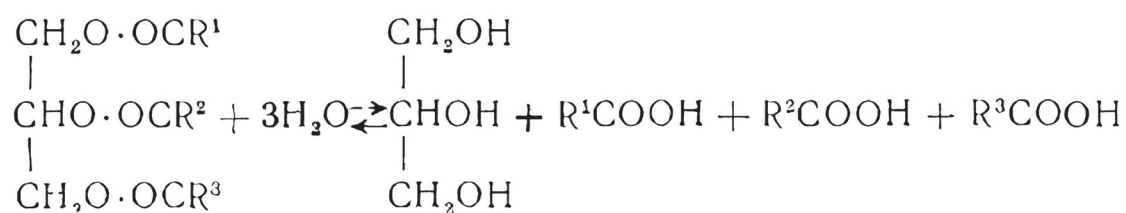
Цель: Ознакомиться с направлениями использования липазы в переработке природных полимеров методами определения липазной активности.

Задание:

1. Ознакомиться с каталитическим действием фермента липазы.
2. Определить активность липазы.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

По международной классификации, фермент, катализирующий расщепление жиров или иных глицеридов с присоединением воды и образованием жирных кислот, называется гидролазой эфиров глицерина. Липаза — это его рабочее название. Липаза расщепляет жиры (триацилглицериды) на глицерин и жирные кислоты по следующей схеме:



Липазы относятся к гидролазам серинового типа. Семейство липазы содержит в качестве каталитически активной группировки триаду аминокислот Ser-His-Asp, осуществляющую перенос протона и каталитическую активацию воды по нуклеофильному механизму. То есть аминокислоты участвуют в элементарных актах активации молекул субстрата в качестве кислот и оснований. Кроме того, в активный центр липаз входит глицин, аминокислота, формирующая геометрию активного центра.

Механизм катализа ферментами, содержащими аминокислоты Ser-His-Asp, включает ацилирование гидроксильной группы фермента с образованием интермедиата (ацилфермента) и его последующим гидролизом. Так как гидроксильная

группа является слабым нуклеофилом, все ферменты этого типа имеют аминокислотные остатки, необходимые для её активации и депротонирования. Эти же остатки активируют молекулу воды на стадии деацетилирования фермента.

По типу укладки полипептидной цепи липазы относят к белкам, построенным из нерегулярно чередующихся α -спиралей и β -листов (α, β — гидролазы). Строение липазы из *Candida rugosa* представлено на рис. 3:

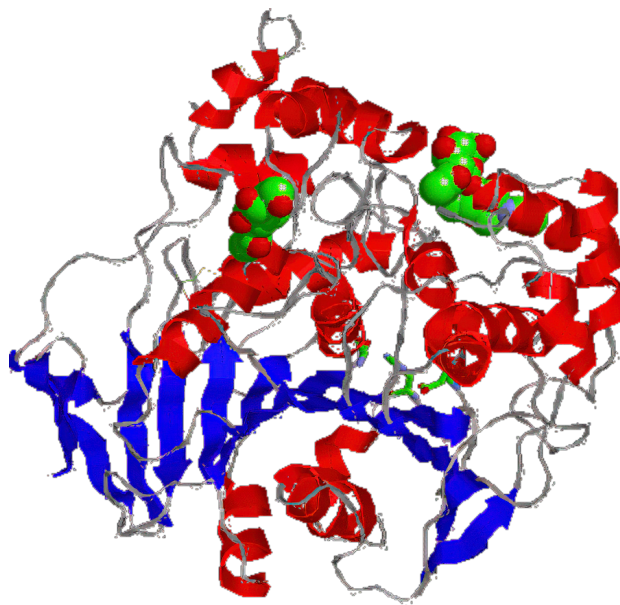


Рис. 3. Строение липазы из *Candida rugosa*

Липолитические ферменты можно разделить на две группы: к первой группе относятся ферменты с широкой субстратной специфичностью, не нуждающиеся для проявления своего действия в каких-либо кофакторах; ко второй — металлоферменты со строгой узкой субстратной специфичностью. Типичным представителем первой группы является липаза, второй — фосфолипаза.

Одна из отличительных особенностей гидролиза жиров липазой заключается в действии фермента на поверхности раздела гидролизуемый жир-вода.

При этом фермент водорастворим, а субстрат, эмульгированный или диспергированный в воде, образует нерастворимую фазу. Для эмульгирования жиров применяют различные природные и синтетические эмульгаторы. При использовании в качестве субстратов эмульсий растительных масел липолитическая активность ферментов может значительно изменяться в зависимости от природы эмульгатора.

Липолитические препараты могут быть получены на основе трёх источников: животные ткани, семена некоторых растений и микроорганизмы. Источником животной липазы является поджелудочная железа. Она может находиться в комплексе с другими панкреатическими ферментами или в свободном состоянии. Липаза содержится в заметных количествах в семенах многих растений: ржи, пшеницы, сои, овса, хлопчатника и особенно клещевины. Липаза последней нерастворима в воде.

Наиболее перспективным источником липаз являются микроорганизмы, это связано с тем, что животное и растительное сырьё не может удовлетворить растущую потребность в этих ферментах. Липазы образуют микроорганизмы различных таксонометрических групп: актиномицеты, бактерии, микроскопические грибы и дрожжи.

Липазы, полученные из различных источников (животные ткани, семена некоторых растений, микроорганизмы), заметно отличаются друг от друга. Так, различия в активности липолитических ферментов даже у различных штаммов одного вида могут колебаться в десятки и сотни раз.

Липолитические ферменты, выделенные из различных источников, различаются по своей термостабильности. Известны липазы, стабильные при 20 и 65°C, но большинство наибольшую стабильность имеет в диапазоне температур от 30 до 40°C. В зависимости от оптимального pH для действия липаз они делятся на кислые (4–6), нейтральные (6,5–7,2) и щелочные (7,5–9).

За единицу ферментативной активности липазы принимают такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40%-ной эмульсии оливкового масла при pH 7,0 и $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч.

ОБЪЕКТЫ, ПРИБОРЫ, РЕАКТИВЫ

Метод основан на определении путем титрования щелочью жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата оливковое масло.

Для проведения этого анализа необходимы *следующие реактивы*: раствор оливкового масла (субстрат), 2%-ный раствор поливинилового спирта, 1н рас-

твор соляной кислоты, 0,05н раствор щелочи, фосфатно-цитратный буфер с рН 7,0, 1%-ный раствор фенолфталеина, 90%-ный раствор спирта, 1%-ный раствор фермента.

ХОД РАБОТЫ

Приготовление субстрата. 100 см³ оливкового масла смешивают со 150 см³ 2%-ного раствора поливинилового спирта в эмульсаторе. Полученную эмульсию выдерживают на льду в течение 60 мин. Если расслаивания не наблюдается, субстрат пригоден к использованию.

Приготовление раствора поливинилового спирта. 20 г спирта помещают в мерную колбу на 1 дм³ и добавляют 800 см³ дистиллированной воды. Суспензию выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляют 0,5 см³ 1н раствора соляной кислоты и непрерывно перемешивают при температуре 80–90°C в течение 1 ч. Затем раствор охлаждают, доводят до рН 7,0 раствором щелочи, объем доводят до 1 дм³ дистиллированной водой и полученный раствор фильтруют.

Проведение опыта: 5 см³ эмульсии — субстрата и 4 см³ буфера с рН 7,0 помещают в колбу на 100 см³, которую закрывают пробкой. Смесь выдерживают на водяной бане при температуре 37°C в течение 10 мин. Затем к смеси добавляют 1 см³ раствора фермента и хорошо перемешивают. Полученную смесь выдерживают при температуре 37°C в течение 60 мин, после чего добавляют 30 см³ этанола для прекращения реакции. Раствор титруют 0,05н раствором щелочи в присутствии 1%-ного раствора фенолфталеина до появления окраски.

Контрольную пробу готовят следующим образом. К смеси субстрата и буфера с рН 7,0, выдержанной при температуре 37°C, добавляют 30 см³ этанола, затем 1 см³ ферментного раствора и смесь немедленно титруют.

Разность между результатами титрования контрольной и опытной проб соответствует количеству 0,05н раствора щелочи, которое пошло на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся из оливкового масла под действием фермента.

Липазную активность фермента ЛС (в ед/г) определяют по формуле:

$$ЛС = \frac{A \times T \times 50}{B}, \quad (7)$$

где ЛС — липазная активность фермента, ед/г; А — разность между результатами титрования опытной и контрольной проб, см³; Т — титр щелочи, г/ мл (0,001996 г/мл); В — концентрация образца ферментного раствора, г/см³; 50 — коэффициент пересчёта в мкмоль жирных кислот.

Для оценки количества молекул фермента среди других белков данной ткани определяют удельную активность (Уд.Ак.) фермента.

Лабораторная работа №6

ПОЛУЧЕНИЕ ПЛЕНОК ДЛЯ КАПСУЛИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Цель: ознакомиться с методикой получения пленок для капсулирования.

Задание: получить пленки и определить их свойства.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами:

- такие ферменты представляют собой гетерогенные катализаторы, легко отделяющиеся от реакционной среды;
- могут использоваться многократно;
- обеспечивают непрерывность каталитического процесса.

Кроме того, иммобилизация ведёт к изменению свойств фермента:

- субстрактной специфичности;
- устойчивости;
- зависимости активности от параметров среды.

Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Так, происходящая при температуре 65 °С термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60%-ом полиакриламидном геле, замедлена в 3600 раз по сравнению с нативным ферментом.

Это обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

Микро- и нанокапсулирование биологически активных веществ (БАВ) — одно из наиболее интенсивно развивающихся направлений в технологии лекарственных и косметических средств. Традиционные методы микрокапсулирования позволяют получить полидисперсные частицы с размерами более 2 мкм. Использование микроэмульсий (лиофильных, монодисперсных систем) в технологии инкапсулирования БАВ позволило бы обеспечить их парентеральное (инъекци-

онное) введение и импульсный режим высвобождения в организме. К сожалению, сведения о применении микроэмульсий для инкапсулирования БАВ немногочисленны и отрывочны.

Материалы, используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими свойствами:

- нерастворимостью;
- высокой химической и биологической стойкостью;
- значительной гидрофильностью;
- достаточной проницаемостью как для ферментов, так и для субстратов и продуктов реакции;
- способностью носителя легко активироваться.

В зависимости от природы носители делятся на:

- органические материалы;
- неорганические материалы.

Органические полимерные носители можно разделить на 2 класса: а) природные; б) синтетические. В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется на группы в зависимости от их строения. Среди природных полимеров выделяют: белковые; полисахаридные; липидные носители, а среди синтетических: полиметиленовые; полиамидные; полиэфирные носители.

К преимуществам природных носителей следует отнести:

- доступность;
 - полифункциональность;
 - гидрофильность;
- а к недостаткам — высокую стоимость.

Из полисахаридов для иммобилизации наиболее часто используют: целлюлозу, декстран, альгинат натрия и их производные. Для придания химической устойчивости их линейные цепи поперечно сшивают эпихлоргидрином. В полученные сетчатые структуры легко вводят различные ионогенные группировки.

Из природных аминсахаридов в качестве носителей для иммобилизации применяют хитин, который в значительных количествах накапливается в виде

отходов в процессе промышленной переработки крабов и креветок. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру.

Среди белков практическое применение в качестве носителей нашли структурные протеины, такие как: кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена — желатин. Эти белки широко распространены в природе, поэтому доступны в больших количествах, дешёвы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента. Белки способны к биодegradации, что очень важно при конструировании иммобилизованных ферментов для биотехнологических целей.

Синтетические полимерные носители включают полимеры на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта, полиамидные и полиуретановые полимеры.

Их преимущества:

- механическая прочность;
- возможность варьирования в широких пределах величины пор и введения различных функциональных групп.

Синтетические полимеры воспроизведены в таких изделиях как трубы, волокна, гранулы. Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.

Носители неорганической природы представляют собой материалы, изготовленные из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, а также силихромы и оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации, для чего носители покрывают плёнкой оксидов алюминия, титана, циркония. Или обрабатывают органическими полимерами.

Основное преимущество неорганических носителей — лёгкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам, неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

Итак, к настоящему времени создано огромное число разнообразных носителей для иммобилизации ферментов. Однако для каждого индивидуального фермента, используемого в конкретном технологическом процессе, необходимо подбирать оптимальные варианты как носителя, так и условий и способов иммобилизации.

ОБЪЕКТЫ, ПРИБОРЫ, РЕАКТИВЫ

1. Состав желатиновых масс для получения капсул, включающий желатин, глицерин, консервант и очищенную воду, имеет соотношение указанных компонентов, массовую долю в %: желатина 35–45; глицерина 31–35; консерванта 0,12–0,25; остальное — очищенная вода.

В качестве консерванта используют нипагин, нипазол, метабисульфит натрия, салициловую кислоту и другие разрешённые к применению в медицине. Для получения оболочки капсул различного цвета в желатиновую массу допускается введение красителя, в частности, кислотно-красного 2С, кофейного напитка «Цикорий» или «Ячменный».

Оптимальное содержание желатина и глицерина определяет эластичность пленки и технологичность изготовления конечного изделия.

Вязкость должна быть между 45 с и 2 мин.

ХОД РАБОТЫ

Желатиновую массу на основе указанных компонентов готовят следующим образом. В реактор подают очищенную воду и глицерин, в полученной смеси при 60 — 65°C растворяют консервант и перемешивают. В случае изготовления цветной желатиновой массы перемешиванием в нее добавляют краситель. Затем смесь охлаждают до 13–20°C, добавляют желатин и перемешивают под вакуумом при остаточном давлении 0,2–0,3 кгс/см² до образования рассыпчатой массы. Затем массу нагревают до 75–80°C и расправляют желатин. Расплавленную массу вакуумируют для удаления воздуха при остаточном давлении 0,2–0,3 кгс/см² и температуре 75–80°C в течение 1–2,5 ч. Затем массу выдерживают 1–2 ч при 70–8°C без вакуума.

Готовую желатиновую массу направляют в термостат, где поддерживают температуру 55 — 65°C. Полученная масса имеет следующие показатели: содержание влаги 28 — 34%; относительная вязкость от 45 секунд до 2 мин.

Методика проверки качества массы. Свежеприготовленную желатиновую массу, нагретую до 65°C, растягивают между большим и указательным пальцем.

Смотрят, образуется ли единая пленка, не растягивающаяся на нити и волокна; если есть ощущение липкости и клейкости после отлипания от пальцев рук, то при дальнейшем использовании такой ЖМ образуются качественные капсулы.

Если не образуется пленка, значит, желатиновая лента не будет формироваться в капсулы (будет склеиваться с одной стороны или шов совсем не будет образовываться), следовательно, не хватает желатина;

Если остаётся липкое клейкое ощущение, то не хватает глицерина и не будет обеспечена дальнейшая пластичность ЖМ. Такую же методику изготовления будем использовать и для массы из альгината натрия.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

1. Практикум по биохимии [Текст] : учеб. пособие ; под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьёвой.—2-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — 509 с.
2. Луценко, Н. Г. Лабораторные работы по энзимологии [Текст] / Н. Г. Луценко, — М.: РХТУ Им. Д. И. Менделеева, 2006. — 64 с.
3. Гамаюрова, В. С. Ферменты. Лабораторный практикум [Текст] : учеб. пособие / В. С. Гамаюрова, М. Е. Зиновьева. — СПб.: Проспект Науки, 2011. — 256 с.
4. Березов, Т. Т. Биологическая химия [Текст] : учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф Коровкин. ; под ред. С.С. Дебова. — М.: Медицина, 1983, — 752 с.
5. Диксон, М. Ферменты [Текст] / М. Диксон, Э. Уэбб : пер. англ. — М.: Мир, 1982.— в 3т.
6. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Текст] : учебник ; под ред. чл.-корр. РАМН С. Е. Северина. — 2011. — 624 с.: ил.
7. Ленинджер, А. Основы биохимии [Текст] : в 3-х т. / А. Ленинджер; Т. 1. пер. с англ. — М.: Мир, 1985. — 367 с.
8. Ферменты [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://ppmand.ru/ppm/cook/ferment.htm>
9. Милованова, Л. Н. Технология изготовления лекарственных форм [Текст] / Л. Н. Милованова. — Ростов-на-Дону: Медицина, 2002. — 503с.
10. Глинов, В. А. Микрокапсулирование и микрогранулирование [Текст] / В. А. Глинов. — М.: Химия, 1979. — 160 с.
11. Чуешов В. И. Промышленная технология лекарств [Текст] : учебник в 2 т./ В. И. Чуешов, О. И. Зайцев, С. Т. Шебанова, М. Ю. Чернов / под ред. В. И. Чуешова. — Харьков: МТК-Книга, Изд-во НФАУ, 2008. Т. 2.
12. Твердые желатиновые капсулы [Электронный ресурс] — URL: <http://www.realcaps.ru/capsule.shtml>. — 10.04.2012 г.

