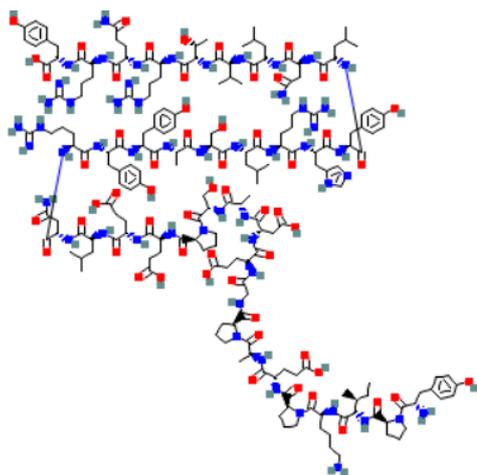


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Л. С. Дышлюк

## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ И КОМПОЗИЦИИ ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. ЧАСТЬ 2

Утверждено редакционно-издательским советом ФГБОУ ВО «КГТУ»  
в качестве учебно-методического пособия по лабораторным работам  
для студентов, обучающихся в бакалавриате  
по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология  
(профиль Пищевая биотехнология)



Калининград  
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»  
2023

Рецензент

доктор технических наук, заведующая кафедрой пищевой биотехнологии  
ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»  
О. Я. Мезенова

Дышлюк, Л. С.

Биологически активные добавки и композиции из сырья животного происхождения. Часть 2: учеб.-методич. пособие по выполнению лабораторных работ для студ. бакалавриата по напр. подгот. 19.03.01 Биотехнология / Л. С. Дышлюк. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 96 с.

Учебно-методическое пособие является руководством по проведению цикла лабораторных работ по дисциплине «Биологически активные добавки и композиции из сырья животного происхождения» студентами, обучающимися по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология. Лабораторные работы предназначены для закрепления теоретического материала и приобретения навыков создания биологически активных добавок и композиций на основе сырья животного и микробиологического происхождения, а также оценки показателей их качества.

Табл. 25, рис. 28, список лит. – 36 наименований.

Учебно-методическое пособие по выполнению цикла лабораторных работ по дисциплине «Биологически активные добавки и композиции из сырья животного происхождения» рассмотрено и одобрено на заседании кафедры пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 26 января 2023 г., протокол № 6.

Учебно-методическое пособие по выполнению цикла лабораторных работ по дисциплине «Биологически активные добавки и композиции из сырья животного происхождения» рекомендовано к изданию на заседании методической комиссии института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 28 февраля 2023 г., протокол № 02.

УДК 613.292

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2023 г.

© Дышлюк Л. С., 2023 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	4
Методические указания к лабораторным работам.....	6
Правила техники безопасности при работе в лаборатории.....	7
<b>Лабораторная работа №1.</b> Выделение альбуминовой и глобулиновой фракций белка из сырья животного происхождения. Осаждение белков при разных условиях.....	10
<b>Лабораторная работа №2.</b> Пчелиный мед как перспективное сырье для создания БАД: анализ органолептических и физико-химических Показателей.....	16
<b>Лабораторная работа №3.</b> Продукты пчеловодства как перспективное сырье для создания БАД: анализ показателей качества.....	24
<b>Лабораторная работа №4.</b> Выделение хитина из панцирей ракообразных и пчелиного подмора, получение хитозана из хитина, определение перспектив их использования в технологии БАД и БАК.....	34
<b>Лабораторная работа №5.</b> Изучение перспектив создания БАД к пище на основе нуклеопротеидов хлебопекарных дрожжей.....	38
<b>Лабораторная работа №6.</b> Получение концентрата каротиноидов из тканей гидробионтов.....	41
<b>Лабораторная работа №7.</b> Изучение особенностей получения компонентов БАД микробиологическим синтезом (теоретическая работа).....	48
Приложение. Теоретический (справочный) материал.....	53
Список литературы.....	93

## ВВЕДЕНИЕ

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для студентов бакалавриата, обучающихся по направлению подготовки «Биотехнология», выполняющих лабораторные работы по дисциплине «Биологически активные добавки и композиции из сырья животного происхождения», которая входит в вариативную часть образовательной программы бакалавриата, формирующей у обучающихся готовность к научно-исследовательской деятельности.

Целью освоения дисциплины «Биологически активные добавки и композиции из сырья животного происхождения» является формирование у студентов знаний и навыков по способам и методам приготовления биологически активных добавок (БАД) и композиций (БАК) из основного и вторичного сырья животного происхождения – молока и молочной сыворотки, рыбы и морепродуктов, различных тканей гидробионтов, животных и птицы. Лабораторные работы способствуют формированию умений и навыков по выделению биологически активных веществ из сырья животного происхождения, изучению их свойств и созданию на их основе биологически активных добавок и функциональных пищевых продуктов.

В результате изучения дисциплины студент должен:

**знать:**

- состав и свойства функциональных ингредиентов в сырье животного происхождения;
- механизмы формирования биологически активных свойств готовых БАД и БАК;
- основные способы извлечения, концентрирования и консервирования биологически активных веществ из натурального сырья;
- технологические приемы переработки вторичного молочного, рыбного и мясного сырья в функциональные продукты;
- основные виды современных биодобавок и перспективы создания новых БАД и БАК;

**уметь:**

- обосновывать рациональные приемы и способы получения БАД и БАК из сырья животного происхождения с учетом его вида и свойств;
- получать продукт с функциональными свойствами в соответствии с требованиями действующей документации;
- осуществлять контроль качества, подлинности и безопасности сырья и готовых БАД, и БАК на основе молочного, рыбного и мясного сырья;

**владеть:**

- технологиями получения БАД и БАК из гидробионтов, мясного и молочного сырья;

– методами использования неприпишевых частей сырья животного происхождения и отходов производства для получения ценных биологически активных композиций;

– способами оценки эффективности, комплексности и экологичности технологий БАД и БАК, а также качества, функциональности и безопасности сырья и готовых изделий.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ

Каждая лабораторная работа начинается с описания цели и задания, которое студенты должны выполнить в процессе выполнения работы. Затем приводятся методические указания по выполнению задания, в том числе перечень необходимых материалов и реактивов, оборудования, лабораторной посуды. Заканчивается каждая лабораторная работа контрольными вопросами, назначение которых – помощь студентам при подготовке к защите лабораторной работы. Теоретический материал к каждой лабораторной работе приведен в приложении, при необходимости с ним можно ознакомиться.

К работам в лаборатории студентов допускают после их ознакомления с правилами безопасности (с общими – в начале семестра и с частными – перед каждым занятием). Допуск к выполнению лабораторной работы происходит при условии положительной оценки ответов студентов на устные вопросы, охватывающие тему лабораторной работы. Полнота ответов студентов оценивается в баллах. Студенты, не подготовившиеся к занятию, к выполнению задания не допускаются и выполняют его вне расписания после повторной проверки готовности.

Отчет по лабораторной работе представляется в рукописном виде.

Защита отчета проходит в форме доклада студента по выполненной работе и ответов на вопросы преподавателя. Студент получает максимальное количество баллов при оформлении отчета в соответствии с требованиями и правильных ответах на заданные вопросы. Основанием для снижения количества баллов является:

- небрежное выполнение отчета;
- низкое качество графического материала (отсутствие указания единиц измерения на графиках и т.д.).

Отчет не может быть принят и подлежит доработке в случае отсутствия:

- необходимых разделов;
- необходимого графического материала;
- выводов по результатам работы.

## **ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ**

### **Общие правила поведения в лаборатории**

1. Лабораторные работы выполняются учащимися во время, предусмотренное расписанием занятий.
2. В лаборатории следует работать в хлопчатобумажном халате, волосы должны быть убраны.
3. Каждый должен работать на закрепленном за ним рабочем месте, на столе во время работы не должно находиться посторонних предметов.
4. Нельзя работать одному в лаборатории, так как при несчастном случае некому будет оказать помощь пострадавшему.
5. В лаборатории необходимо соблюдать порядок и тишину, правила техники безопасности.
6. Недопустимо в лаборатории принимать пищу, пить воду из химической посуды.
7. Нельзя пробовать на вкус и вдыхать химические вещества.
8. Запрещается проводить какие-либо опыты, не предусмотренные программой практикума, выносить реактивы из лаборатории.
9. К выполнению лабораторной работы можно приступать после тщательного изучения методики и правил работы с приборами.
10. После окончания работы следует вымыть посуду, отключить электроприборы, выключить воду, привести в порядок рабочее место. После выполнения работы необходимо вымыть руки с мылом.

### **Правила работы с химическими реактивами**

Выполнение лабораторной работы неразрывно связано с применением различных реактивов. При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать ряд правил. Несоблюдение их может привести к отравлениям, ожогам, повреждениям глаз, дыхательных путей и другим нежелательным последствиям.

1. На всех склянках с реактивами всегда должны быть этикетки с указанием названия реактива и степени его чистоты. Если на банке нет этикетки или надписи, такой реактив применять нельзя.
2. Твердые химические реактивы брать только шпателем, пинцетом или ложечкой.
3. Реактивы необходимо предохранять от загрязнения.
4. Реактивы следует расходовать экономно.
5. Реактивы, изменяющиеся под действием света, следует хранить только в желтых или темных склянках.
6. Не следует брать реактивы с соседних столов.

### **Правила работы со стеклянной химической посудой**

Работа со стеклянной посудой требует внимания, навыков и выполнения ряда правил. Основным травмирующим фактором являются острые осколки стекла, способные вызвать порезы рук, а также ожоги при неосторожном обращении с нагретыми до высокой температуры частями стеклянной посуды.

1. Для работы используют только чистую посуду без трещин и других повреждений.
2. В опытах с нагревом необходимо пользоваться посудой, которая имеет соответствующую маркировку.
3. При сборке приборов, при укреплении колб в штативе, пробирок в пробиркодержателе не следует применять больших усилий.

### **Правила техники безопасности при работе с нагревательными приборами**

В лаборатории применяют различные нагревательные приборы: электрические плитки, бани, сушильные шкафы, муфельные печи и т. п.

1. Каждый работающий в лаборатории должен знать, где расположены средства пожаротушения, и уметь ими пользоваться.
2. Запрещено использовать неисправные нагревательные приборы.
3. Нельзя оставлять без присмотра работающие электронагревательные приборы.
4. При работе с водяной баней нельзя пробовать степень нагрева воды рукой.
5. После окончания работы необходимо выключить приборы, привести в порядок рабочее место.

### **Оказание первой помощи при ожогах и других несчастных случаях**

Многие химические вещества обладают достаточной силой, чтобы разрушить ткани организма человека. Наибольшим разрушающим потенциалом обладают концентрированные кислоты и щелочи. При воздействии кислот и щелочей на организм человека образуются химические ожоги. Химический ожог – это повреждение тканей, возникающее под действием кислот, щелочей, солей тяжелых металлов, едких жидкостей и других химически активных веществ. Химическое отравление представляет собой ответ организма на вдыхание, проникновение через слизистые оболочки или кожу, проглатывание, химических веществ. Первая помощь при несчастных случаях:

1. При воспламенении горючей жидкости на одежде работающего необходимо немедленно погасить пламя на пострадавшем, завернув его в шерстяное или проасбестованное одеяло.
2. При ожогах концентрированными растворами кислот пораженное место следует промыть сильной струей холодной воды в течение нескольких ми-

нут, затем – 2-3 %-ным раствором соды, после чего наложить повязку, смоченную 1-2 %-ным раствором перманганата калия. При сильных ожогах следует после оказания первой помощи обратиться к врачу.

3. При ожогах концентрированными растворами щелочей пораженное место следует промыть большим количеством холодной воды до тех пор, пока кожа перестанет казаться скользкой, затем – 1-2 %-ным раствором борной или уксусной кислоты, после чего наложить повязку, смоченную спиртовым раствором танина или 1-2 %-ным раствором перманганата калия.

4. При термических ожогах пострадавшее место необходимо многократно смочить раствором перманганата калия и спиртом, затем смазать мазью от ожогов.

5. При попадании какого-либо химического реактива в глаза следует промыть их обильным количеством воды и немедленно обратиться к врачу.

6. При отравлении газообразными веществами следует немедленно вывести пострадавшего на свежий воздух, а затем направить к врачу.

7. При порезах подставьте рану под струю холодной воды. Обработайте рану перекисью водорода (3 %), а края раны йодом или зеленкой.

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1. ВЫДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВОЙ И ГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИЙ БЕЛКА ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ

## 1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по фракционированию белков сырья животного происхождения, а также по осаждению белков при нагревании и воздействии солей тяжелых металлов.

## 2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- выделить альбумин и глобулины из яичного белка с использованием метода высаливания, рассчитать выход глобулинов (п. 3.1);
- выделить глобулины из яичного белка с использованием метода, основанного на понижении ионной силы, рассчитать выход глобулинов (п. 3.2);
- осадить яичный белок при кипячении (п. 3.3);
- осадить яичный белок воздействием солей тяжелых металлов (п. 3.4);
- сформулировать вывод о наиболее эффективном методе фракционирования белков животного происхождения, а также о наиболее эффективном методе осаждения яичного белка.

## 3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

**Материалы и реактивы:** неразведенный яичный белок, сульфат аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , насыщенный раствор сульфата аммония (7,67 г до 10 мл), 10%-ный раствор едкого натра, 1%-ный раствор меди сернокислой, дистиллированная вода.

**Оборудование, лабораторная посуда:** фильтровальная бумага, воронки стеклянные, штативы с мерными пробирками, автоматические пипетки, накопники, весы аналитические.

### 3.1 Выделение альбумина и глобулинов из яичного белка методом высаливания

*Принцип метода.* Белки в растворе и, соответственно, в организме сохраняются в нативном состоянии за счет факторов устойчивости, к которым относятся заряд белковой молекулы и гидратная оболочка вокруг нее.

Удаление этих факторов приводит к агрегированию молекул белков и выпадению их в осадок. Осаждение белков может быть обратимым и необра-

тимым в зависимости от реактивов и условий реакции. На практике реакции осаждения используют для выделения альбуминовой и глобулиновой фракций белков плазмы крови, количественной характеристики их устойчивости в плазме, обнаружения белков в биологических жидкостях и освобождения от них с целью получения гомогенного белкового раствора. Из глобулиновой фракции впоследствии выделяют антитела к различным антигенам.

Под действием факторов осаждения белки выпадают в осадок, но после прекращения действия (удаления) этих факторов белки вновь переходят в растворимое состояние и приобретают свои нативные свойства.

Одним из видов обратимого осаждения белков является высаливание. Насыщенным раствором сульфата аммония осаждается альбуминовая фракция белков, полунасыщенным раствором – глобулиновая фракция.

В пробирку налить 30 капель неразведенного яичного белка. Добавить 30 капель насыщенного раствора сульфата аммония и перемешать. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония. При этом глобулиновая фракция осаждается, а альбуминовая остается в растворе. Осадок глобулинов отфильтровать (рисунок 1.1).

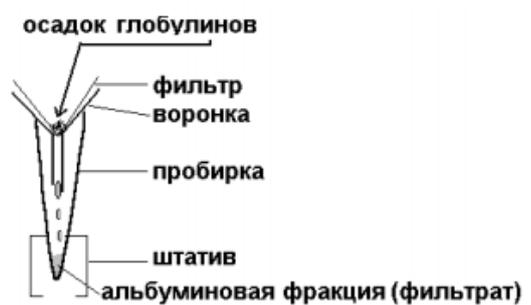


Рисунок 1.1 – Разделение альбуминовой и глобулиновой фракций

Осадок на фильтре высушить при комнатной температуре и взвесить. Рассчитать массовый выход глобулинов (в процентах) по формуле:

$$W = \frac{m_{\text{осадка}}}{m_{\text{исх. яичного белка}}} \cdot 100 \quad (1.1)$$

Полученные результаты занести в таблицу 1.1.

К фильтрату добавлять  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до тех пор, пока не прекратится растворение соли. Должен выпасть осадок – это альбумины. Сущность реакции заключается в дегидратации молекул белка.

### 3.2 Выделение глобулинов из яичного белка методом, основанным на понижении ионной силы

*Принцип метода.* При десятикратном разведении яичного белка дистиллированной водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в растворе.

Вылить 10-15 г неразбавленного яичного белка в стакан на 500 см<sup>3</sup>, затем добавить 250 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и содержимое перемешать стеклянной палочкой. Раствор перенести в мерный цилиндр и объем довести дистиллированной водой до 300 см<sup>3</sup>. Раствор оставить на 30 мин при комнатной температуре для образования хлопьевидного осадка глобулинов. 20 см<sup>3</sup> суспензии профильтровать через складчатый фильтр.

Наличие белка на фильтре проверить биуретовой реакцией: для этого воронку с фильтром вставить в чистую пробирку и на фильтр налить 1 см<sup>3</sup> 10 %-ного раствора NaOH и 1 каплю 1 %-ного раствора сульфата меди. Появляется фиолетовое окрашивание. Для пептидной (амидной) группы характерна лактам-лактимная таутомерия: В щелочной среде преобладающая лактимная (енольная) форма полипептида взаимодействует с медью с образованием стабильного окрашенного комплекса.

Осадок на фильтре высушить при комнатной температуре и взвесить. Рассчитать массовый выход глобулинов (в процентах) по формуле (1.1).

Результаты, полученные в пп. 3.1–3.2, отразить в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Результаты выделения альбумина и глобулинов из яичного белка

Метод выделения	Наблюдаемый эффект	Массовый выход глобулинов, %
Высаливание сульфатом аммония (п. 3.1)		
Понижение ионной силы (п. 3.2)		

Сформулировать вывод о наиболее эффективном методе выделения глобулинов из яичного белка.

### 3.3 Осаждение яичного белка при кипячении

*Принцип метода.* Присутствие белков открывается кипячением, поскольку почти все белки свертываются при нагревании в нейтральной или слабокислой среде. В сильнокислых и щелочных средах раствор белка при кипячении не коагулирует и может дать осадок лишь при добавлении достаточного количе-

ства какой-нибудь нейтральной соли (NaCl). Устойчивость белка в растворе зависит от приобретения положительного заряда в случае сильнокислой среды и усиления отрицательного – в щелочной среде.

Полное и быстрое осаждение белков происходит при достижении изоэлектрической точки. Изоэлектрической точкой называется такое значение pH, при котором частицы белка не передвигаются в электрическом поле ни к аноду, ни к катоду, и, следовательно, суммарный электрический заряд их равен нулю.

Итак, важную роль в свертывании белков при нагревании играет концентрация водородных ионов, т.е. реакция среды, и присутствие солей. Работа проводится с целью выяснения значения pH для растворимости белков при нагревании. Сравнивают отношение к нагреванию нейтральных, слабокислых и сильнокислых, а также щелочных растворов белка.

В 5 пробирок наливают по 15 капель 10 %-ного раствора яичного белка. В первой пробирке нейтральный раствор белка нагревают до кипения. Наблюдается опалесценция, разрушаются водные оболочки вокруг белка, и происходит укрупнение взвешенных его частиц. Мицеллы белка несут заряд и удерживаются во взвешенном состоянии.

Во второй пробирке раствор белка нагревают до кипения и прибавляют 3 капли 1 %-ного раствора уксусной кислоты. Выпадает хлопьевидный осадок белка. Частицы белка теряют заряд, так как приближаются к изоэлектрическому состоянию.

В третью пробирку добавляют 10 капель 1 %-ного раствора уксусной кислоты. При кипячении жидкости осадка не образуется, белковые частицы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость.

Четвёртая пробирка: 10 капель 1 %-ной уксусной кислоты и 4 капли – насыщенного раствора хлористого натрия. Нагреть. Выпадает белый хлопьевидный осадок белка, так как частицы белка теряют заряд вследствие взаимодействия белка с разноименно заряженными ионами NaCl.

В пятую пробирку добавляют 5 капель 10 %-ного раствора NaOH, создавая щелочную среду. При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка увеличивается.

Наблюдаемые результаты занести в таблицу 1.2.

Таблица 1.2 – Результаты осаждения яичного белка при кипячении

Номер пробирки	Воздействие	Наблюдаемый эффект
1	Кипячение	
2	Кипячение + 3 капли 1 %-ной CH <sub>3</sub> COOH	
3	Кипячение + 10 капель 1 %-ной CH <sub>3</sub> COOH	

Номер пробирки	Воздействие	Наблюдаемый эффект
4	Кипячение + 10 капель 1 %-ной $\text{CH}_3\text{COOH}$ + 4 капли $\text{NaCl}$ (насыщ.)	
5	Кипячение + 5 капель 10 %-ной $\text{NaOH}$	

### 3.4 Осаждение яичного белка воздействием солей тяжелых металлов

*Принцип метода.* Осаждение белков солями тяжелых металлов происходит при небольших концентрациях солей. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) адсорбируют, образуя с ними соли и комплексные соединения, растворимые в избытке этих солей (за исключением солей азотнокислого серебра и хлористой ртути), но нерастворимые в воде.

Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков, т.е. денатурацию. Растворение осадка в избытке солей называется адсорбционной пептизацией. Явление происходит вследствие появления одноименного положительного заряда на частицах белка.

*Осаждение белков медным купоросом.* К 15 каплям 10 %-ного раствора яичного белка прибавить 3-4 капли 1 %-ного раствора сернокислой меди; образуется бледно-голубой осадок, нерастворимый в воде. К другой такой же порции раствора белка прилить 3-4 капли 1 %-ного раствора сернокислой меди, а затем еще 10-15 капель и наблюдать растворение осадка.

*Осаждение белков уксуснокислым свинцом.* К 15 каплям 10 %-ного раствора яичного белка прибавить 5 капель 5 %-ного раствора уксуснокислого свинца. Образуется осадок, также не растворимый в воде, но легко растворяющийся в избытке осадителя.

Наблюдаемые результаты занести в таблицу 1.3.

Таблица 1.3 – Результаты осаждения яичного белка воздействием солей тяжелых металлов

Воздействие	Наблюдаемый эффект
1 %-ный раствор $\text{CuSO}_4$	
5 %-ный раствор $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	

Сформулировать вывод о наиболее эффективном методе осаждения яичного белка.

#### **4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Назовите методы фракционирования белков.
2. Опишите сущность осаждения белков высаливанием.
3. Дайте определение изоэлектрического осаждения белка.
4. Опишите сущность процесса диализа.
5. Назовите факторы, приводящие к денатурации белка.

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2. ПЧЕЛИНЫЙ МЕД КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАД: АНАЛИЗ ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

## 1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по изучению органолептических и физико-химических показателей пчелиного меда и анализу биопотенциала данного вида животного сырья.

## 2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- ознакомиться с теоретическими положениями относительно видов пчелиного меда, показателей качества пчелиного меда и возможных областей применения;
- охарактеризовать органолептические показатели разных видов пчелиного меда (п. 3.1);
- охарактеризовать физико-химические показатели разных видов пчелиного меда (п. 3.2);
- изучить образцы разных видов пчелиного меда на предмет фальсификации (п. 3.3);
- сформулировать вывод о биопотенциале изученных видов меда.

## 3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

**Материалы и реактивы:** разные виды пчелиного меда, 1 %-ный раствор калия железосинеродистого, 0,1 %-ный, 10 %-ный и 40 %-ный растворы едкого натра, 1 %-ный раствор метиленовой сини, 1 %-ный раствор камфары в концентрированной соляной кислоте, 1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина, натрий хлористый, 1 %-ный раствор крахмала, раствор Люголя, 96 %-ный этиловый спирт, диэтиловый эфир, резорцин, 1 %-ный раствор уксуснокислого свинца, лакмусовая бумага.

**Оборудование, лабораторная посуда:** термостат, рефрактометр, водяная баня, весы аналитические и технические, стаканы стеклянные, пробирки стеклянные, спиртовка, пробиркодержатель, колбы конические вместимостью 250 см<sup>3</sup>, фарфоровая ступка с пестиком, чашки фарфоровые для выпаривания.

### 3.1 Изучение органолептических показателей разных видов пчелиного меда

*Определение аромата меда:* 10–20 г мёда поместить в стеклянный стаканчик, закрыть крышкой и нагреть в термостате при температуре 40–45 °С в течение 10 мин. Затем стаканчик открыть и определить аромат.

*Определение вкуса и консистенции меда:* установить соответствие вкуса и консистенции разных видов меда требованиям ГОСТ 19792-2017.

Полученные результаты занести в таблицу 2.1.

Таблица 2.1 – Органолептические показатели разных видов меда

Образец меда	Аромат	Вкус	Консистенция	Кристаллизация

### 3.2 Изучение физико-химических показателей разных видов пчелиного меда

*3.2.1 Определение механических примесей в меде:* при определении консистенции и степени кристаллизации цветочного меда проводят внешний осмотр мёда на наличие механических примесей. Обычно в это время хорошо заметны в мёде трупы пчел, личинки, кусочки восковых сотов и другие инородные тела, не удаленные при отстаивании или фильтрации мёда. При сильном загрязнении мёда в нем могут быть обнаружены волосы, растительные волокна, щепки, песок и др.

Для выявления степени загрязнения мёда в 5 см<sup>3</sup> воды растворить 5 г мёда, подогреть до 50 °С, вылить в пробирку с прозрачным стеклом и определить степень загрязнения. Механические загрязнения могут оседать на дно, всплывать на поверхность раствора или же находиться во взвешенном состоянии. С учетом этого изучить степень механических загрязнений и в зависимости от их количества провести общую санитарную оценку мёда. По санитарным правилам в мёде не допускается наличие пчел или частей их тел, пчелиных личинок, куколок, кусочков воска, перги и других посторонних примесей (песок, стружка, растительные волокна и др.). Результаты занести в сводную таблицу 2.3.

*3.2.2 Определение массовой доли воды в меде (в соответствии с ГОСТ 31774 «Мед. Рефрактометрическое определение воды»):* Натуральный мёд с влажностью не более 21 % имеет показатель преломления 1,4855. На призму рефрактометра нанести каплю исследуемого мёда и отметить показание прибора. Массовая доля воды в меде в зависимости от коэффициента рефракции представлена в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Зависимость массовой доли воды в меде от показателя преломления

Показатель преломления при 20 °С	Массовая доля воды, %	Показатель преломления при 20 °С	Массовая доля воды, %	Показатель преломления при 20 °С	Массовая доля воды, %
1,5044	13,0	1,4935	17,2	1,4830	21,4
1,5038	13,2	1,4930	17,4	1,4825	21,6
1,5033	13,4	1,4925	17,6	1,4820	21,8
1,5028	13,6	1,4920	17,8	1,4815	22,0
1,5023	13,8	1,4915	18,0	1,4810	22,2
1,5018	14,0	1,4910	18,2	1,4805	22,4
1,5012	14,2	1,4905	18,4	1,4800	22,6
1,5007	14,4	1,4900	18,6	1,4795	22,8
1,5002	14,6	1,4895	18,8	1,4790	23,0
1,4997	14,8	1,4890	19,0	1,4785	23,2
1,4992	15,0	1,4885	19,2	1,4780	23,4
1,4987	15,2	1,4880	19,4	1,4775	23,6
1,4982	15,4	1,4875	19,6	1,4770	23,8
1,4976	15,6	1,4870	19,8	1,4765	24,0
1,4971	15,8	1,4865	20,0	1,4760	24,2
1,4966	16,0	1,4860	20,2	1,4755	24,4
1,4961	16,2	1,4855	20,4	1,4750	24,6
1,4956	16,4	1,4850	20,6	1,4745	24,8
1,4950	16,6	1,4845	20,8	1,4740	25,0
1,4946	16,8	1,4840	21,0		
1,4940	17,0	1,4835	21,2		

На точность показаний влияет ряд факторов:

- правильность работы рефрактометра (предварительно рефрактометр необходимо настроить согласно прилагаемой к нему инструкции);
- температура меда (определение проводят при 20 °С; при температуре выше 20°С прибавляют 0,00023 на 1°С, а при температуре ниже 20°С – вычитают 0,00023 на 1°С);
- наличие кристаллов (закристаллизованный мед нагревают в пробирке с закрытой пробкой при 50 °С, затем охлаждают до 20 °С; воду, сконденсировавшуюся на стенках пробирки, и мед перемешивают стеклянной палочкой);
- наличие механических примесей.

Содержание воды в цветочном мёде можно определить также путем взвешивания капли. В основе этого метода лежит свойство жидкостей, имеющих разные удельные веса, занимать разное положение при их смешивании. Для этого нужно иметь заранее приготовленный раствор-эталон из хлористого

кальция с удельным весом 1,4, что соответствует удельному весу цветочного мёда, содержащего 22 % воды. Раствор-эталон налить в пробирку до 3/4 ее объема и затем осторожно с высоты 1–2 см от поверхности внести каплю исследуемого мёда (пипеткой или стеклянной палочкой). Если капля мёда опускается вниз, значит, ее удельный вес больше удельного веса раствора-эталона. Следовательно, количество воды в исследуемом меде ниже 22 %. Если капля всплывет, удельный вес исследуемого мёда меньше удельного веса раствора-эталона. Значит, и содержание воды в нем выше предельного.

### *3.2.3 Определение содержания редуцирующих сахаров в меде (в соответствии с ГОСТ 32167-2013, экспресс-метод):*

Метод основан на определении оптической плотности раствора железосинеродистого калия после того, как он прореагирует с редуцирующими сахарами. Метод испытания включает определение сахаров меда до и после инверсии.

При использовании экспресс-метода в колбу отмерить 10 см<sup>3</sup> 1 %-ного раствора красной кровяной соли (калия железосинеродистого), 2,5 см<sup>3</sup> 10 %-ного раствора едкого натра и 5,6 см<sup>3</sup> 0,25 %-ного раствора исследуемого мёда. Содержимое колбы нагреть до кипения, кипятить 1 мин и прибавить 1 каплю 1 %-ного раствора метиленовой сини. Если раствор не обесцвечивается, то в исследуемой пробе не редуцирующих веществ меньше 82 % на сухое вещество. Результат занести в сводную таблицу 2.3.

### *3.2.4 Определение содержания сахарозы в меде (в соответствии с ГОСТ 32167-2013, экспресс-метод):*

Метод основан на растворении исследуемой пробы в воде, хроматографическом (ВЭЖХ) разделении сахаров меда, их регистрации при помощи рефрактометрического детектора и количественном определении по методу внешних стандартов.

При использовании экспресс-метода в пробирку к 5 см<sup>3</sup> 0,25 %-ного раствора мёда добавить 0,2 см<sup>3</sup> 40 %-ного раствора едкого натра, смесь поместить в кипящую водяную баню на 10 мин, а затем охладить до 20-25 °С. Раствор приобретает соломенно-желтую окраску. К 1 см<sup>3</sup> охлажденного раствора прилить 2 см<sup>3</sup> 1 %-ного раствора камфары в концентрированной соляной кислоте и тщательно встряхнуть. При наличии истинной сахарозы в меде более 2 % раствор окрашивается от вишневого до бордово-красного цвета. Результаты наблюдений занести в сводную таблицу 2.3.

### 3.2.5 Определение свободной кислотности меда (в соответствии с ГОСТ 32169-2013):

В цветочном мёде содержатся свободные органические кислоты, а также связанные органические и неорганические кислоты. Всего насчитывают до пятнадцати кислот. К ним относят: яблочную, молочную, винную, щавелевую, лимонную, фосфорную и другие кислоты. При закисании мёда кислотность увеличивается за счет накопления уксусной кислоты. Муравьиной кислоты в цветочном мёде очень мало, поэтому определение кислотности по муравьиной кислоте не во всех случаях бывает точным.

Показатель кислотности мёда желательно выражать в традиционных единицах измерения – градусах Тернера. Кислотность в нормальных градусах равна 0,1 см<sup>3</sup> 0,1 %-ного раствора едкого натрия, израсходованного при титровании на нейтрализацию 100 г мёда при индикаторе фенолфталеине.

В химический стаканчик емкостью 50–100 см<sup>3</sup> отвесить 5–10 г мёда с точностью до 0,01, навеску растворить в нейтральной дистиллированной воде, добавить 2–3 капли 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина и титровать 0,1 %-ным раствором едкого натра до розового окрашивания. Для выражения кислотности мёда по муравьиной или яблочной кислоте произвести расчет по формулам:

по муравьиной кислоте:

$$X = \frac{a \cdot 0,0046 \cdot 100}{10}, \quad (2.1)$$

по яблочной кислоте:

$$X = \frac{a \cdot 0,0067 \cdot 100}{10}, \quad (2.2)$$

где X – содержание кислоты;

a – 0,0046 – количество муравьиной кислоты;

0,0067 – количество яблочной кислоты, эквивалентное 1 см<sup>3</sup> 0,1 %-ного раствора едкого натрия, г;

10 – количество меда, взятое для титрования, г;

100 – пересчет на 100 г.

Кислотность доброкачественного пчелиного меда по муравьиной кислоте находится в пределах 0,03–0,21, по яблочной кислоте – 0,04–0,33. Повышение кислотности характеризует начало брожения мёда, а понижение кислотности может быть следствием фальсификации мёда. Результаты занести в сводную таблицу 2.3.

### 3.2.6 Определение диастазного числа меда (в соответствии с ГОСТ 34232-2017):

Диастазное число характеризует активность амилолитических ферментов меда. Единица диастазной активности (единица Готе или Шаде) определяется количеством ферментов, расщепляющих 0,01 г крахмала за 1 ч при температуре 40 °С в соответствии с методом испытаний. Диастазное число выражают количеством единиц Готе (или Шаде) в 1 г меда.

Нагревание натурального пчелиного мёда выше 60 °С приводит к понижению активности ферментов в мёде. При температуре выше 80–90 °С ферменты инактивируются.

Для определения диастазного числа в штатив поместить 9 пробирок, пронумеровать их и налить градуированной пипеткой медовый раствор: в первую – 1,0 см<sup>3</sup>, во вторую – 1,3 см<sup>3</sup>, в третью – 1,7 см<sup>3</sup>, четвертую – 2,1 см<sup>3</sup>, пятую – 2,8 см<sup>3</sup>, шестую – 3,6 см<sup>3</sup>, седьмую – 4,6 см<sup>3</sup>, восьмую – 6,0 см<sup>3</sup>, девятую – 7,7 см<sup>3</sup>. В каждую пробирку налить дистиллированную воду до 10 см<sup>3</sup> и 0,5 см<sup>3</sup> раствора поваренной соли (0,58 г соли на 100 см<sup>3</sup> воды), затем 5 см<sup>3</sup> свежеприготовленного 1 %-ного раствора крахмала и перемешать. Пробирки с содержимым нагреть до 40–45 °С и выдержать их при этой температуре 1 ч, затем быстро охладить водой и в каждую пробирку добавить по одной капле раствора йода (раствор Люголя).

При этом в пробирках раствор, содержащий нерасщепленный крахмал, окрашивается в синий цвет. При отсутствии крахмала он становится желтоватым (что обусловлено окраской раствора меда с каплей йода). В тех пробирках, в которых крахмал разложился не полностью, от йода раствор приобретает фиолетовую окраску различной интенсивности. Последняя слабоокрашенная пробирка перед рядом обесцвеченных (с желтоватым оттенком) соответствует диастазной силе исследуемого мёда.

Диастазное число вычислить по формуле:

$$D = \frac{Y \cdot 10}{A}, \quad (2.3)$$

где Y – количество 1 %-ного раствора крахмала, см<sup>3</sup>;

A – количество 10 %-ного раствора мёда, влитого в пробирку, соответствующее диастазной силе исследуемого мёда, см<sup>3</sup>;

10 – коэффициент пересчета 10 %-ного раствора мёда на мёд неразведенный.

Результаты занести в сводную таблицу 2.3.

Таблица 2.3 – Результаты определения физико-химических показателей пчелиного меда

Образец меда	Механические примеси	Массовая доля воды, %	Содержание редуцирующих сахаров, %	Содержание сахарозы, %	Свободная кислотность, °Т	Диастазное число

### 3.3 Изучение образцов пчелиного меда на предмет фальсификации

*3.3.1 Определение прозрачности:* Натуральный мёд из-за присутствия белковых веществ имеет мутность (опалесценцию), которая увеличивается при зарождении кристаллов глюкозы. Прозрачность меда указывает на его возможную фальсификацию.

#### *3.3.2 Добавление крахмальной патоки:*

1) Реакция на декстрины: к водному раствору мёда (1:2 или 1:3) прилить 96 %-ный этиловый спирт и взболтать. Раствор становится молочно-белым и в отстое образуется прозрачная полужидкая масса (декстрины). При отсутствии примеси крахмальной патоки ферментативного гидролиза раствор остается прозрачным и только в месте соприкосновения слоев меда и спирта появляется едва заметная муть, исчезающая при взбалтывании.

2) Реакция на оксиметилфурфурол: в сухой фарфоровой ступке тщательно перемешать пестиком в течение 2-3 мин около 3 г мёда и 15 см<sup>3</sup> эфира. Эфирную вытяжку перенести в сухую фарфоровую чашку и повторить перемешивание меда с новой порцией 15 см<sup>3</sup> эфира. Эфирные вытяжки объединить и дать эфиру испариться под тягой при температуре не выше 30°C. К остатку прибавить 2–3 капли раствора резорцина. Появление красного или вишнево-красного цвета в течение 5 мин свидетельствует о добавлении крахмальной патоки кислотного гидролиза.

3) Реакция на йод: Пробу мёда растворить в воде (1:1) и добавить 1 каплю раствора йода. Изменение окрашивания раствора указывает на присутствие крахмала или продуктов его гидролиза.

*3.3.3 Добавление свекловичной патоки:* к 2 см<sup>3</sup> 10 %-ного раствора мёда прибавить 1 см<sup>3</sup> уксуснокислого свинца и 10 см<sup>3</sup> этилового спирта. Обильный желтовато-белый осадок указывает на примесь свекловичной патоки. При ее небольшом содержании (до 10 %) образуется не осадок, а обильная молочно-белая муть. Раствор натурального мёда дает только легкое помутнение.

3.3.4 *Добавление желатина или клея*: нагреть раствор мёда (1:2) с водным раствором едкой щелочи. Смоченной лакмусовой бумажкой испытать реакцию паров при кипячении раствора. При наличии желатина или клея в мёде образуется аммиак, который вызывает посинение красной лакмусовой бумажки.

3.3.5 *Добавление муки или крахмала*: 5 г мёда растворить в 5-10 см<sup>3</sup> воды, нагреть до кипения и прибавить несколько капель раствора Люголя. При наличии муки или крахмала появляется синее окрашивание.

Результаты определения фальсификации образцов пчелиного меда занести в таблицу 2.4.

Таблица 2.4 – Результаты определения фальсификации образцов пчелиного меда

Образец меда	Результат выявления фальсификации («+» или «-»)				
	прозрачность	добавление крахмальной патоки	добавление свекловичной патоки	добавление желатина или клея	добавление муки или крахмала

Основываясь на результатах всех проведенных экспериментов, сформулировать вывод о биопотенциале изученных видов меда и охарактеризовать возможные направления их использования в технологиях получения биологически активных добавок и композиций.

#### 4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. По каким критериям классифицируется пчелиный мед?
2. Дайте определение цветочного и падевого меда.
3. Назовите основные растения–медоносы.
4. По каким показателям проводится контроль качества меда?
5. Какими способами может быть фальсифицирован пчелиный мед? Опишите методы выявления фальсификации.
6. Дайте определение диастазного числа меда.

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3. ПРОДУКТЫ ПЧЕЛОВОДСТВА КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАД: АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА

## 1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по изучению органолептических и физико-химических показателей продуктов пчеловодства и анализу биопотенциала данного вида животного сырья.

## 2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- ознакомиться с ассортиментом продукции пчеловодства (пчелиный воск, маточное молочко, прополис, перга) и требованиями нормативной документации, предъявляемыми к ней;
- охарактеризовать органолептические показатели продуктов пчеловодства (п. 3.1);
- охарактеризовать физико-химические показатели продуктов пчеловодства (пп. 3.2–3.4);
- сформулировать вывод о биопотенциале изученных видов продукции пчеловодства.

## 3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

**Материалы и реактивы:** образцы прополиса, пчелиной перги, маточного молочка, 0,1 М раствор калия марганцовокислого, 20 %-ный раствор серной кислоты, 96 %-ный этиловый спирт, 10 %-ный раствор йодистого калия, 0,1 М раствор тиосульфата натрия, 0,5 %-ный раствор крахмала, йод кристаллический, уксусная кислота ледяная, бром, хлороформ.

**Оборудование, лабораторная посуда:** мерные колбы вместимостью 50 см<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup>, 1000 см<sup>3</sup>, мерные цилиндры вместимостью 1000, 250 см<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup>, конические колбы вместимостью 50 см<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup>, 150 см<sup>3</sup>, пипетки стеклянные объемом 1 см<sup>3</sup>, 2 см<sup>3</sup>, 5 см<sup>3</sup>, 10 см<sup>3</sup>, стаканы химические вместимостью 50 см<sup>3</sup>, воронки стеклянные, бумага фильтровальная, бюретка на 25 см<sup>3</sup>, бюксы металлические, эксикатор с хлористым кальцием, палочки стеклянные, весы аналитические и технические, секундомер, мешалка магнитная, фотоэлектроколориметр, шкаф сушильный, баня водяная.

### 3.1 Изучение органолептических показателей продуктов пчеловодства

3.1.1 Изучение органолептических показателей прополиса: внешний вид, консистенцию, цвет, структуру прополиса оценить визуально при естественном дневном освещении; запах и вкус – органолептически. Полученные данные занести в таблицу 3.1.

Таблица 3.1 – Органолептические показатели прополиса

Наименование показателя	Норма – в соответствии с ГОСТ 28886–2019	Значение показателя для исследуемых образцов
Внешний вид	Комки, крошки или брикеты	
Цвет	Темно-зеленый, бурый или серый с зеленоватым, желтым или коричневым оттенками	
Запах	Характерный смолистый (смесь запахов меда, душистых трав, хвои, тополя)	
Консистенция	Плотная, в изломе неоднородная	
Структура	Вязкая – при 20 °С – 40 °С, твердая – ниже 20 °С	
Вкус	Горький, слегка жгучий	

Сделать вывод о соответствии/или несоответствии тестируемых образцов прополиса требованиям ГОСТ 28886–2019 по органолептическим показателям.

3.1.2 Изучение органолептических показателей перги: внешний вид, цвет, пораженность восковой молью, наличие посторонних примесей оценить визуально при естественном дневном освещении. Крупные комочки измерить линейкой. Запах и вкус определить органолептически. Полученные данные занести в таблицу 3.2.

Таблица 3.2 – Органолептические показатели перги

Наименование показателя	Норма – в соответствии с ГОСТ 31776-2012	Значение показателя для исследуемых образцов
Внешний вид	Мелкие неравномерные комочки	
Цвет	От темно-желтого до коричневого	
Поражение восковой молью	Не допускается	
Запах	Характерный медово-пыльцевой	
Вкус	Кисло-сладкий, слегка горьковатый	

Сделать вывод о соответствии/или несоответствии тестируемых образцов перги требованиям ГОСТ 31776-2012 по органолептическим показателям.

3.1.3 Изучение органолептических показателей маточного молочка: определение внешнего вида, консистенции, цвета, запаха, вкуса и признаков брожения провести органолептически. Полученные данные занести в таблицу 3.3.

Таблица 3.3 – Органолептические показатели маточного молочка

Наименование показателя	Норма – в соответствии с ГОСТ 28888–2017	Значение показателя для исследуемых образцов
Внешний вид и консистенция	Однородная, непрозрачная масса	
Цвет	Белый с желтоватым оттенком или слабо-кремовый	
Запах	Приятный, с медовым оттенком	
Признаки брожения	Не допускается	

Сделать вывод о соответствии/или несоответствии тестируемых образцов маточного молочка требованиям ГОСТ 28888–2017 по органолептическим показателям.

## 3.2 Изучение физико-химических показателей прополиса

### 3.2.1 Определение показателя окисляемости (подлинности) прополиса:

Метод основан на определении времени окисления ненасыщенных соединений, входящих в состав прополиса, и выражается временем (в секундах), в течение которого происходит обесцвечивание раствора марганцовокислого калия.

Приготовление 0,1 М раствора  $KMnO_4$ : в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> внести навеску марганцовокислого калия массой 3,2 г и мерным цилиндром вместимостью 1000 см<sup>3</sup> добавить 700 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Объем довести до метки дистиллированной водой, хранить в темной склянке не более 3 месяцев.

Приготовление раствора серной кислоты массовой долей 20 %: в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> налить мерным цилиндром вместимостью 1000 см<sup>3</sup> 700 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, затем мерным цилиндром вместимостью 250 см<sup>3</sup> осторожно внести 124 см<sup>3</sup> серной кислоты плотностью 1,84 г/см<sup>3</sup>. Объем довести до метки дистиллированной водой.

#### *Проведение измерения:*

Навеску прополиса массой 0,02 г поместить в коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, пипеткой налить 5 см<sup>3</sup> этилового спирта и выдержать 1 ч. Затем в колбу вместимостью 150 см<sup>3</sup> налить 100 см<sup>3</sup> свежепрокипяченной и охлажденной дистиллированной воды, раствор тщательно перемешать на магнитной мешалке и профильтровать через бумажный фильтр.

В колбу вместимостью 150 см<sup>3</sup> пипеткой внести 10 см<sup>3</sup> фильтрата, мерным цилиндром вместимостью 100 см<sup>3</sup> прибавить 90 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и перемешать раствор. В стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup> пипеткой внести 2 см<sup>3</sup> раствора прополиса и добавить пипеткой 1 см<sup>3</sup> раствора серной кислоты массовой долей 20 %. Раствор в стакане перемешать плавными круговыми движениями руки, добавить капельницей одну каплю раствора марганцовокислого калия молярной концентрации 0,1 моль/дм<sup>3</sup> и одновременно включить секундомер. Время (секунды) исчезновения розовой окраски раствора соответствует величине показателя окисляемости.

### 3.2.2 *Определение массовой доли флавоноидных и других фенольных соединений в прополисе:*

Метод основан на экстракции флавоноидных и других фенольных соединений из прополиса и колориметрическом измерении интенсивности окрашивания образовавшегося соединения.

Навеску прополиса массой 0,05 г поместить в коническую колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup>, пипеткой налить 10 см<sup>3</sup> этилового спирта, перемешать на магнитной мешалке 10 мин. Смесь профильтровать через складчатый бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup>. Пипеткой внести в кювету полученный раствор. Кювету поместить в кюветодержатель фотоэлектроколориметра и измерить оптическую плотность раствора при длине волны 400 нм. В качестве контроля использовать этиловый спирт.

Массовую долю флавоноидных и других фенольных соединений (%) в прополисе рассчитать по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 24}{m \cdot 8,37}, \quad (3.1)$$

где  $A$  – оптическая плотность испытуемого раствора,

24 – объем разведения, см<sup>3</sup>,

$m$  – масса навески прополиса, г,

8,37 – коэффициент пропорциональности оптической плотности раствора и концентрации флавоноидных и других фенольных соединений прополиса для фотоэлектроколориметра при длине волны 400 нм.

### 3.2.3 *Определение йодного числа прополиса:*

Йодное число показывает наличие и количество ненасыщенных соединений в основном ненасыщенных жирных кислот, способных образовывать с йодом комплексы с переносом заряда.

Приготовление раствора йодистого калия с массовой долей 10 %: в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> налить примерно 70 см<sup>3</sup> дистиллированной во-

ды, внести 10,0 г йодистого калия, перемешать и довести объем до метки дистиллированной водой.

Приготовление раствора тиосульфата натрия концентрации 0,1 моль/дм<sup>3</sup>:  
в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> внести навески тиосульфата натрия массой 25,0 г и безводного карбоната натрия массой 0,1 г. Мерным цилиндром вместимостью 1000 см<sup>3</sup> добавить 700 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешать. Объем довести до метки дистиллированной водой, перенести в темную склянку и выдержать 10 сут. Раствор тиосульфата натрия годен в течение 1 года.

Приготовление раствора крахмала с массовой долей 0,5 %: навеску растворимого крахмала массой 0,4 г растереть в небольшом количестве дистиллированной воды в химическом стакане вместимостью 50 см<sup>3</sup> и полученную массу влить в колбу вместимостью 150 см<sup>3</sup>, содержащую 100 см<sup>3</sup> кипящей дистиллированной воды. Раствору дать отстояться и использовать верхнюю часть отстоя. Раствор годен в течение месяца.

Приготовление смеси бром-йод: в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 1000 см<sup>3</sup> поместить навеску кристаллического йода массой 13,2 г, порциями добавить ледяную уксусную кислоту и растворить на водяной бане при температуре 60–70 °С. Раствор охладить, пипеткой добавить 3 см<sup>3</sup> брома, затем полученный объем довести ледяной уксусной кислотой до метки. Смесь бром-йод хранить в темной склянке с притертой пробкой в течение 1 мес.

*Проведения измерения:*

В коническую колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup> поместить навеску прополиса массой 0,05 г, пипеткой прилить 2,5 см<sup>3</sup> хлороформа и 6,25 см<sup>3</sup> смеси брома-йода. Колбу закрыть пробкой, смоченной раствором йодистого калия, раствор перемешать и выдержать в темном месте 1 ч. В колбу добавить пипеткой 5 см<sup>3</sup> раствора йодистого калия с массовой долей 10 %, мерным цилиндром вместимостью 100 см<sup>3</sup> добавить 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, капельницей внести 4–7 капель раствора крахмала; перемешать и титровать из бюретки 0,1 М раствором тиосульфата натрия концентрации до обесцвечивания раствора.

Одновременно в тех же условиях провести титрование контрольного раствора, содержащего 2,5 см<sup>3</sup> хлороформа, 6,25 см<sup>3</sup> смеси брома-йода, 5 см<sup>3</sup> раствора йодистого калия с массовой долей 10 %, 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 4–7 капель раствора крахмала.

Йодное число (%) прополиса вычислить по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 0,01269 \cdot 100}{m}, \quad (3.2)$$

где  $V$  – объем раствора тиосульфата натрия, израсходованный на титрование контрольного опыта, см<sup>3</sup>,

$V_1$  – объем раствора тиосульфата натрия, израсходованный на титрование раствора прополиса, см<sup>3</sup>,

$m$  – масса навески прополиса, г.

Результаты определения показателя окисляемости, йодного числа прополиса и массовой доли в нем флавоноидных и других фенольных соединений занести в таблицу 3.4.

Таблица 3.4 – Физико-химические показатели прополиса

Наименование показателя	Норма – в соответствии с ГОСТ 28886–2019	Значение показателя для исследуемых образцов
Окисляемость, с	Не более 22,0	
Массовая доля флавоноидных и других фенольных соединений, %	Не менее 25,0	
Йодное число, %	Не менее 35,0	

Сделать вывод о соответствии/или несоответствии тестируемых образцов прополиса требованиям ГОСТ 28886–2019 по физико-химическим показателям.

### 3.3 Изучение физико-химических показателей перги

#### 3.3.1 Определение массовой доли воды в перге:

Открытый стеклянный стаканчик для взвешивания (или металлическую бюксу) с помещенной рядом крышкой высушить в сушильном шкафу при температуре  $(105 \pm 2)$  °С в течение 1 ч, после чего закрыть крышкой и охладить в эксикаторе до  $(20 \pm 2)$  °С в течение 40–60 мин. В подготовленный стаканчик (бюксу) отвесить 0,25 г перги, распределяя равномерным слоем. Открытый стаканчик (или бюксу) с продуктом и крышку рядом с ним поставить в сушильный шкаф при температуре  $(105 \pm 2)$  °С и сушить не менее 3 ч.

Затем стаканчик (или бюксу) с продуктом закрыть крышкой, поместить в эксикатор над хлористым кальцием, охладить в течение 1 ч, взвесить с отсчетом показания до четвертого десятичного знака и снова сушить. Каждое последующее высушивание проводить в течение 40–60 мин. Высушивание, охлаждение и взвешивание продолжать до постоянной массы. Постоянную массу считают достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями не превышает 0,001 г.

Массовую долю воды (%) в перге рассчитать по формуле:

$$W = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_2}, \quad (3.3)$$

где  $m_1$  – масса навески до высушивания, г,  
 $m_2$  – масса навески после высушивания, г.

### 3.3.2 Определение показателя окисляемости перги:

Навеску перги массой 0,7 г поместить в химический стаканчик вместимостью 50 см<sup>3</sup>, налить 20,0 см<sup>3</sup> свежeproкипяченной и охлажденной дистиллированной воды и перемешать в течение 3–5 мин стеклянной палочкой, 2 см<sup>3</sup> раствора перенести в другой химический стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup> и добавить 1,0 см<sup>3</sup> раствора серной кислоты (20 %). Раствор перемешать плавными круговыми движениями руки, добавить одну каплю (0,035–0,045 см<sup>3</sup>) 0,1 М раствора марганцовокислого калия и одновременно включить секундомер. Время (секунды) исчезновения розовой окраски подкисленного раствора соответствует показателю окисляемости.

### 3.3.3 Определение массовой доли воска в перге:

В коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> отвесить 15,0 г перги, прибавить 50 см<sup>3</sup> 96 %-ного этилового спирта и нагреть на водяной бане при частом перемешивании до кипения. Горячий раствор декантировать через бумажный фильтр. Остаток в колбе обработать один раз 30 см<sup>3</sup> горячего 96 %-ного спирта, который прибавлять к ранее полученному раствору.

Не растворившийся остаток перенести на фильтр и промыть горячим 96 %-ным спиртом. Промывание считается законченным, когда в капле фильтрата на часовом стекле при охлаждении не появится белый осадок. Объединенные фильтраты охладить до 50 °С, при этом из раствора выпадает белый осадок – воск, который отфильтровать через бумажный фильтр, предварительно высушенный до постоянной массы при температуре окружающего воздуха. Осадок на фильтре промыть холодным 96 %-ным спиртом, фильтр с осадком высушить при температуре окружающего воздуха до постоянной массы.

Массовую долю воска (%) в перге рассчитать по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 100 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - W)}, \quad (3.4)$$

где  $m$  – масса воска, г,

$m_1$  – масса перги, г,

$W$  – массовая доля воды в перге, %.

Результаты определения массовой доли воды и воска в перге, показателя окисляемости перги занести в таблицу 3.5.

Таблица 3.5 – Физико-химические показатели перги

Наименование показателя	Норма – в соответствии с ГОСТ 31776-2012	Значение показателя для исследуемых образцов
Массовая доля воды, %	Не более 18,0	
Массовая доля воска, %	Не более 5,0	
Окисляемость, с	Не более 23,0	

Сделать вывод о соответствии/или несоответствии тестируемых образцов перги требованиям ГОСТ 31776-2012 по физико-химическим показателям.

### 3.4 Изучение физико-химических показателей маточного молочка

#### 3.4.1 Определение массовой доли сухих веществ в маточном молочке:

В две предварительно высушенные до постоянной массы бюксы отвесить две навески маточного молочка массой по 0,05 г (результат взвешивания записать с точностью до четвертого десятичного знака). Открытые бюксы с испытуемым продуктом и крышкой от бюксы поставить в сушильный шкаф и сушить 3 ч при температуре 60 °С. Затем бюксы с продуктом закрыть крышкой и поставить в эксикатор над хлористым кальцием, охладить в течение 1 ч. Каждую бюксу с испытуемым продуктом взвесить и снова сушить в течение 1 ч. Высушивание продолжать до постоянной массы. Постоянную массу считают достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями после одночасового высушивания и одночасового охлаждения в эксикаторе не превышает 0,001 г.

Массовую долю сухих веществ (%) в маточном молочке рассчитать по формуле:

$$X = 100 - W, \quad (3.5)$$

где W – массовая доля воды в маточном молочке, рассчитывается по формуле (3.3).

#### 3.4.2 Определение массовой доли воска в маточном молочке:

В коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> поместить 3 г продукта, прибавить 50 см<sup>3</sup> 96 %-ного этилового спирта и нагреть в водяной бане при частом перемешивании до кипения. Горячий раствор декантировать через бумажный фильтр. Остаток в колбе обработать один раз 30 см<sup>3</sup> горячего 96 %-ного спирта, который прибавить к ранее полученному раствору.

Не растворившийся остаток перенести на фильтр и промыть горячим 96 %-ным спиртом. Промывание считают законченным, когда в капле фильтрата на часовом стекле при охлаждении не появится белый осадок. Объединенные фильтраты охладить до 5 °С. Из раствора выпадает белый осадок – воск, который отфильтровать через бумажный фильтр, предварительно высушенный до постоянной массы при температуре окружающего воздуха. Осадок на фильтре промыть холодным 96 %-ным спиртом, фильтр с осадком высушить при температуре окружающего воздуха до постоянной массы.

Массовую долю воска (%) в маточном молочке рассчитать по формуле (3.4).

### 3.4.3 Определение показателя окисляемости маточного молочка:

Навеску маточного сырого молочка массой 0,064 г поместить в химический стаканчик вместимостью 50 см<sup>3</sup>, налить 20 см<sup>3</sup> свежeproкипяченной и охлажденной дистиллированной воды и перемешать в течение 3–5 мин стеклянной палочкой. 2 см<sup>3</sup> раствора перенести в другой химический стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup> и добавить 1 см<sup>3</sup> раствора серной кислоты с массовой долей 20 %. Раствор перемешать плавными круговыми движениями руки, добавляют одну каплю (0,035–0,045 см<sup>3</sup>) 0,1 М раствора марганцовокислого калия и одновременно включить секундомер.

Время (секунды) исчезновения розовой окраски подкисленного раствора соответствует показателю окисляемости. Испытание проводить при температуре раствора 18–22 °С в день его приготовления.

Результаты определения массовой доли сухих веществ и воска в маточном молочке, показателя окисляемости маточного молочка занести в таблицу 3.6.

Таблица 3.6 – Физико-химические показатели маточного молочка

Наименование показателя	Норма – в соответствии с ГОСТ 28888–2017	Значение показателя для исследуемых образцов
Массовая доля сухих веществ, %	30,0–37,0	
Массовая доля воска, %	Не более 2,0	
Окисляемость, с	Не более 10,0	

Сделать вывод о соответствии/или несоответствии тестируемых образцов маточного молочка требованиям ГОСТ 28888–2017 по физико-химическим показателям.

#### 4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определения прополиса, маточного молочка, перги, пчелиного воска. Опишите химический состав этих продуктов пчеловодства.
2. Какие требования предъявляются к показателям качества прополиса? На основании какого нормативного документа?
3. Какие требования предъявляются к показателям качества перги? На основании какого нормативного документа?
4. Какие требования предъявляются к показателям качества маточного молочка? На основании какого нормативного документа?
5. Какие требования предъявляются к показателям качества пчелиного воска? На основании какого нормативного документа?
6. Какими биологическими свойствами характеризуются прополис, перга, маточное молочко, пчелиный воск?

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4. ВЫДЕЛЕНИЕ ХИТИНА ИЗ ПАНЦИРЕЙ РАКООБРАЗНЫХ И ПЧЕЛИНОГО ПОДМОРА, ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА ИЗ ХИТИНА, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ БАД И БАК

## 1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по выделению хитина из панцирей ракообразных и пчелиного подмора, а также по деацетилированию хитина.

## 2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- выделить хитин из панцирей ракообразных, рассчитать массовый выход хитина (п. 3.1);
- выделить хитин-меланиновый комплекс из пчелиного подмора, рассчитать массовый выход хитин-меланинового комплекса (п. 3.2);
- провести деацетилирование выделенного хитина с получением хитозана, рассчитать массовый выход хитозана (п. 3.3);
- провести деацетилирование выделенного хитин-меланинового комплекса с получением хитозан-меланинового комплекса, рассчитать массовый выход хитозан-меланинового комплекса (п. 3.4);
- провести качественную реакцию на хитин (п. 3.5);
- предложить области возможного применения хитина и хитозана в технологиях БАД и БАК.

## 3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

**Материалы и реактивы:** высушенные панцири ракообразных, высушенный пчелиный подмор, 4 %-ный раствор соляной кислоты, бумага индикаторная, 5 %-ный, 10 %-ный и 50%-ный растворы гидроксида натрия, 3 %-ный раствор пероксида водорода, серная кислота концентрированная, спиртовой раствор резорцина.

**Оборудование, лабораторная посуда:** стаканы химические, колбы конические вместимостью 250 см<sup>3</sup>, баня водяная, термометр лабораторный, шкаф сушильный, весы технические, воронки стеклянные, бумага фильтровальная, пробирки стеклянные.

### 3.1 Выделение хитина из панцирей ракообразных

Навеску (20 г, записать точную массу навески) высушенных панцирей ракообразных измельчить и с целью деминерализации залить 4 %-ным раствором соляной кислоты при гидромодуле 1:6. Смесь инкубировать в течение 1,5 часов при комнатной температуре. Кислоту слить, панцири промыть проточной водой до нейтрального значения рН промывных вод (по индикаторной бумаге). Далее с целью депротеинизации промытые панцири залить 5 %-ным раствором гидроксида натрия при гидромодуле 1:6. Инкубировать смесь в течение 1,5 ч при температуре 70–80 °С. Затем снова произвести промывку проточной водой. При необходимости стадии деминерализации и депротеинизации можно повторить. Полученный хитин отфильтровать и высушить в сушильном шкафу при температуре 60 °С до остаточной влажности не более 10 %, высушенный осадок взвесить. Высушенный хитин использовать для получения хитозана. Рассчитать массовый выход хитина в процентах (%) по отношению к исходному сырью по формуле:

$$W = \frac{m_{\text{хитина}}}{m_{\text{исходного сырья}}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Полученные результаты занести в сводную таблицу 4.1.

### 3.2 Выделение хитин-меланинового комплекса из пчелиного подмора

Навеску (20 г, записать точную массу навески) высушенного пчелиного подмора измельчить и с целью получения водорастворимого меланина залить 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, инкубировать смесь при температуре 80 °С в течение 1 ч. Отфильтровать меланиновую фракцию, а полученный осадок высушить на воздухе или в сушильном шкафу при 60 °С и использовать для получения хитин-меланинового комплекса. Для этого осадок залить 10 %-ным раствором гидроксида натрия при гидромодуле 1:5, выдержать при температуре 45–55 °С в течение 2 ч. Полученный осадок отфильтровать и промыть дистиллированной водой до нейтрального значения рН.

С целью обесцвечивания хитин-меланинового комплекса обработать его 3 %-ным раствором перекиси водорода при температуре 45–55 °С в течение 1 ч. После фильтрации реакционной смеси твердый остаток – обесцвеченный хитин-меланиновый комплекс – промыть дистиллированной водой до рН промывных вод 7,0 и высушить в сушильном шкафу при температуре 60 °С до остаточной влажности не более 10 %, высушенный осадок взвесить. Обесцвеченный хитин-меланиновый комплекс использовать далее для получения хитозан-меланинового комплекса. Рассчитать массовый выход хитин-меланинового

комплекса в процентах (%) по отношению к исходному сырью по формуле (4.1). Полученные результаты занести в сводную таблицу 4.1.

### **3.3 Получение хитозана путем деацетилирования хитина**

Навеску высушенного хитина (2–5 г), полученного из панцирей ракообразных (п. 3.1), залить 50 %-ным раствором гидроксида натрия (гидромодуль 1:5) и провести деацетилирование в течение 2 ч при температуре 90–95 °С, отфильтровать. Осадок на фильтре (хитозан) промыть дистиллированной водой до достижения рН=7. Полученный хитозан высушить в сушильном шкафу при температуре 55 °С до остаточной влажности не более 10 %, высушенный осадок взвесить. Рассчитать массовый выход хитозана в процентах (%) по отношению к исходному сырью по формуле (4.1). Полученные результаты занести в сводную таблицу 4.1.

### **3.4 Получение хитозан-меланинового комплекса путем деацетилирования хитин-меланинового комплекса**

Навеску высушенного хитин-меланинового комплекса (2–5 г), полученного по п. 3.2, залить 50 %-ным раствором гидроксида натрия (гидромодуль 1:5) и провести деацетилирование в течение 2 ч при температуре 90–95 °С, отфильтровать. Осадок на фильтре (хитозан-меланиновый комплекс) промыть дистиллированной водой до достижения рН=7. Полученный хитозан-меланиновый комплекс высушить в сушильном шкафу при температуре 55 °С до остаточной влажности не более 10 %, высушенный осадок взвесить. Рассчитать массовый выход хитозан-меланинового комплекса в процентах (%) по отношению к исходному сырью по формуле (4.1). Полученные результаты занести в сводную таблицу 4.1.

### **3.5 Качественная реакция на хитин**

К навеске (1 г) измельченного хитина прилить 2 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. После полного растворения хитина в кислоте к смеси добавить 2–3 капли спиртового раствора резорцина. Появление в пробирке на поверхности раствора кольца красно-малинового цвета свидетельствует о присутствии в реакционной смеси углеводов.

Проанализировав данные таблицы 4.1, сделать вывод о наиболее перспективном виде сырья для получения хитина и хитинсодержащих материалов.

Таблица 4.1 – Результаты определения массового выхода хитина и хитозана, полученных из различного хитинсодержащего сырья

Продукт	Массовый выход, %	Продукт	Массовый выход, %
Хитин, выделенный из панцирей ракообразных		Хитозан	
Хитин-меланиновый комплекс, выделенный из пчелиного подмора		Хитозан-меланиновый комплекс	

Сформулировать вывод о биопотенциале хитина и хитозана, а также охарактеризовать возможные направления их использования в технологиях получения биологически активных добавок и композиций.

#### 4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение хитина и хитозана.
2. В каких областях промышленности находят применение хитин и хитозан?
3. Какие способы получения хитина и хитозана вы знаете?
4. Опишите сущность биотехнологического метода получения хитинсодержащих материалов.
5. Опишите сущность электрохимического метода получения хитинсодержащих материалов.
6. Какие свойства хитина и хитозана позволяют рассматривать их в качестве перспективного сырья для создания биологически активных добавок и композиций?

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5. ИЗУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВ СОЗДАНИЯ БАД К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ

## 1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по выделению нуклеопротеидов из хлебопекарных дрожжей, проведению гидролиза нуклеопротеидов и качественных реакций на пентозы и пуриновые основания.

## 2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- выделить нуклеопротеиды из хлебопекарных дрожжей (п. 3.1);
- провести гидролиз выделенных нуклеопротеидов (п. 3.2);
- провести качественные реакции на пентозы (п. 3.3);
- провести качественные реакции на пуриновые основания (п. 3.4);
- сформулировать рекомендации по применению нуклеопротеидов при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

## 3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

**Материалы и реактивы:** дрожжи хлебопекарные *Saccharomyces cerevisiae* прессованные, 1 %-ный и 30 %-ный растворы гидроксида натрия, ацетат натрия, 70 %-ный раствор этилового спирта, речной песок, тщательно промытый и прокаленный, 5 %-ный раствор серной кислоты, 7 %-ный раствор сернокислой меди, 1 %-ный раствор тимола, концентрированная серная кислота, 1 %-ный раствор нитрата серебра, концентрированный раствор аммиака.

**Оборудование, лабораторная посуда:** ступка с пестиком, воронка для фильтрования, химические стаканы, стеклянная палочка, обратный холодильник, колбы круглодонные, фильтры бумажные, спиртовка, бумага индикаторная, весы аналитические и технические.

**Принцип метода.** Все нуклеопротеиды можно подвергнуть гидролитическому распаду, при котором происходит последовательный разрыв сначала эфирных, а затем гликозидных связей. Сначала нуклеопротеиды распадаются на простые белки и нуклеиновые кислоты. Затем белки могут подвергнуться гидролизу до пептидов и аминокислот. Нуклеиновые кислоты расщепляются с образованием нуклеотидов, которые затем подвергаются гидролизу с образованием пуриновых и пиримидиновых оснований, рибозы или дезоксирибозы и фосфорной кислоты. При мягком гидролизе происходит сравнительно неглубокий распад белка. Пиримидиновые нуклеотиды при таком гидролизе не распа-

даются, а пуриновые распадаются с образованием пуриновых оснований (аденин и гуанин), рибозы и фосфорной кислоты. Проводя гидролиз при определенных условиях, можно последовательно выделить различные промежуточные продукты гидролитического распада нуклеопротеидов и определить их с помощью качественных реакций.

### 3.1 Выделение нуклеопротеидов из хлебопекарных дрожжей

К 6 г (записать точную массу навески) пекарских дрожжей добавить 2 см<sup>3</sup> воды, немного песка и полученную смесь растереть в ступке с 1 %-ным раствором гидроксида натрия. Раствор щелочи добавлять небольшими порциями (по 2–3 см<sup>3</sup>), всего расходовать около 25 см<sup>3</sup>. Массу дрожжей растирать около 15–20 мин до получения гомогенной массы. Содержимое ступки профильтровать через складчатый фильтр и перелить в стакан. Затем в стакан добавить 5 г ацетата натрия и, перемешивая стеклянной палочкой, растворить его.

По стенке стакана осторожно наслоить 25 см<sup>3</sup> 70 %-ного этанола. Медленно круговыми движениями перемешать жидкости. Образуются крупные хлопья нуклеопротеидов, которые постепенно осаждаются на дно стакана. Отделить осадок нуклеопротеидов фильтрацией на бумажном фильтре. Осадок высушить при комнатной температуре и рассчитать массовый выход нуклеопротеидов (%) по отношению к исходному сырью по формуле:

$$W = \frac{m_{\text{нуклеопротеидов}}}{m_{\text{исходного сырья}}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

Полученные нуклеопротеиды сохранить для следующих экспериментов.

### 3.2 Гидролиз нуклеопротеидов

Осадок нуклеопротеидов, полученный в предыдущем опыте (п. 3.1), растворить в 25 см<sup>3</sup> 5 %-го раствора серной кислоты и перенести в круглодонную колбу. Колбу закрыть пробкой с обратным холодильником. Реакционную смесь нагреть на электрической плитке до кипения и кипятить в течение 1,5 ч.

Смесь охладить и профильтровать через бумажный фильтр. С фильтратом проделать качественные реакции.

### 3.3 Качественные реакции на пентозы

1) Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу.

К 5 каплям гидролизата, полученного по заданию 3.2, добавить 10 капель 30 %-ного раствора едкого натра и 1-3 капли 7 %-ного раствора сернокислой

меди до появления стойкого осадка гидроокиси меди. Жидкость перемешать и нагреть до кипения. В результате выпадает красный осадок закиси меди или желтый осадок гидрата окиси меди вследствие окисления рибозы и восстановления гидрата окиси меди в гидрат закиси меди.

2) К 1 см<sup>3</sup> фильтрата (задание 3.2) добавить 2–3 капли 1 %-го раствора тимола и по стенке пробирки осторожно наслоить 1 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет.

### 3.4 Качественные реакции на пуриновые основания

К 5 каплям 1 %-го раствора нитрата серебра приливать концентрированный раствор аммиака до растворения образовавшегося вначале осадка. В другую пробирку влить 2 см<sup>3</sup> фильтрата (задание 3.2) и приливать к нему концентрированный раствор аммиака до щелочной по индикаторной бумаге реакции. Во вторую пробирку влить содержимое первой пробирки. Через несколько минут выпадают хлопья солей пуриновых оснований.

Наблюдаемые результаты качественных реакций занести в таблицу 5.1.

Таблица 5.1 – Результаты качественных реакций

Качественная реакция	Наблюдаемый результат
Проба Троммера с серноокислой медью	
Реакция с тимолом и серной кислотой	
Реакция с нитратом серебра и аммиаком	

По итогам проделанной работы сформулировать рекомендации по применению нуклеопротеидов при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

## 4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите морфологически и физиологические свойства дрожжей *S. cerevisiae*.
2. Дайте определение нуклеопротеидов.
3. Приведите примеры дезоксирибонуклеопротеидов и рибонуклеопротеидов.
4. На какие компоненты гидролизуются нуклеиновые кислоты?
5. Опишите методику гидролиза нуклеопротеидов.
6. Опишите методику качественного определения пентоз – продуктов гидролиза нуклеопротеидов.
7. Опишите методику качественного определения пуриновых оснований – продуктов гидролиза нуклеопротеидов.

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАТА КАРОТИНОИДОВ ИЗ ТКАНЕЙ ГИДРОБИОНТОВ

## 1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по извлечению концентрата каротиноидов из тканей гидробионтов.

## 2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- выделить концентрат каротиноидов из тканей гидробионтов животного и растительного происхождения с использованием разных экстрагентов, подобрать рациональные параметры извлечения: экстрагент, температура; рассчитать массовый выход каротиноидов (п. 3.1);
- выделить концентрат каротиноидов из тканей гидробионтов животного и растительного происхождения с использованием разных экстрагентов с добавлением органических кислот, подобрать рациональные параметры извлечения: экстрагент, органическая кислота, температура; рассчитать массовый выход каротиноидов (п. 3.2);
- сопоставить между собой значения массового выхода каротиноидов, полученных из гидробионтов животного и растительного происхождения, и эффективности их извлечения;
- сформулировать рекомендации по дальнейшему использованию полученных экстрактов каротиноидов в производстве биологически активных добавок и композиций.

## 3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

**Материалы и реактивы:** панцири ракообразных, мясо криля, хребты лососевых рыб, красные водоросли (например, *Palmaria palmata*, *Porphyra*, *Furcellaria*), ацетон, подсолнечное масло, 50 %-ный пропиленгликоль, 5 %-ный раствор лимонной кислоты, 5 %-ный раствор яблочной кислоты.

**Оборудование, лабораторная посуда:** стаканы химические, колбы конические, фарфоровая ступка с пестиком, колба Бунзена, воронка Бюхнера, водоструйный насос, центрифуга, весы технические, спектрофотометр, термостат.

### 3.1 Выделение концентрата каротиноидов из тканей гидробионтов с использованием разных экстрагентов

Подготовленное сырье гидробионтов (панцири ракообразных, мясо криля, хребты лососевых рыб, красные водоросли) измельчить до размера частиц 3-5 мм. Измельченное сырье (10–20 г, записать точную массу навески) залить экстрагентами (ацетон, подсолнечное масло, 50 %-ный пропиленгликоль) при гидромодуле 1:3 и инкубировать при разных температурах (25 °С, 40 °С, 60 °С) в течение 3 ч при непрерывном перемешивании. Каждые 0,5 ч отбирать пробы экстрактов и измерять оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 450 нм для оценки степени экстрагирования каротиноидов. По окончании экстракции отделить экстракт каротиноидов от плотного остатка путем фильтрования под вакуумом или центрифугирования.

Результаты измерения оптической плотности занести в таблицу 6.1.

Таблица 6.1 – Результаты измерения оптической плотности экстрактов каротиноидов

Продолжительность экстракции, ч	Оптическая плотность экстрактов $A_{450}$								
	ацетон			подсолнечное масло			50 %-ный пропиленгликоль		
	25 °С	40 °С	60 °С	25 °С	40 °С	60 °С	25 °С	40 °С	60 °С
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
панцири ракообразных									
0,5									
1,0									
1,5									
2,0									
2,5									
3,0									
мясо криля									
0,5									
1,0									
1,5									
2,0									
2,5									
3,0									
хребты лососевых рыб									
0,5									
1,0									
1,5									
2,0									

Окончание таблицы 6.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2,5									
3,0									
красные водоросли									
0,5									
1,0									
1,5									
2,0									
2,5									
3,0									

На основании анализа данных таблицы 6.1 сделать вывод о параметрах (экстрагент, температура), позволяющих наиболее эффективно извлекать каротиноиды из тканей гидробионтов. Сравнить эффективность извлечения каротиноидов из гидробионтов животного и растительного происхождения.

Осадок высушить при комнатной температуре и взвесить. Рассчитать массовый выход каротиноидов (%) по отношению к исходному сырью по формуле:

$$W = \frac{m_{\text{осадка каротиноидов}}}{m_{\text{исходного сырья}}} \cdot 100 \quad (6.1)$$

Расчетные данные занести в таблицу 6.2.

Таблица 6.2 – Результаты расчета выхода каротиноидов, извлеченных из тканей гидробионтов разными экстрагентами

Наименование гидробионта	Выход каротиноидов, %, при использовании разных экстрагентов и различных температурных режимах								
	ацетон			подсолнечное масло			50 %-ный пропиленгликоль		
	25 °С	40 °С	60 °С	25 °С	40 °С	60 °С	25 °С	40 °С	60 °С
панцири ракообразных									
мясо криля									
хребты лососевых рыб									
красные водоросли									

Сопоставить между собой значения массового выхода каротиноидов, полученных из гидробионтов животного и растительного происхождения.

### **3.2 Выделение концентрата каротиноидов из тканей гидробионтов с использованием разных экстрагентов с добавлением органических кислот**

Каротиноиды в мягких тканях гидробионтов находятся в виде стабильных комплексов с белками, что требует определенного воздействия для разрушения данных связей. Показано, что органические и неорганические кислоты способствуют разрушению каротинопротеиновых комплексов и, следовательно, применение кислоты может увеличить выход каротиноидов при экстрагировании.

Подготовленное сырье гидробионтов (панцири ракообразных, мясо криля, хребты лососевых рыб, красные водоросли) измельчить до размера частиц 3-5 мм. Измельченное сырье (10–20 г, записать точную массу навески) залить экстрагентами (ацетон, подсолнечное масло, 50 %-ный пропиленгликоль), в которые предварительно добавлены лимонная и яблочная кислоты (в концентрации 5 %), при гидромодуле 1:3 и инкубировать при разных температурах (25 °С, 40 °С, 60 °С) в течение 3 ч при непрерывном перемешивании. Каждые 0,5 ч отбирать пробы экстрактов и измерять оптическую плотность на спектрофотометре при 450 нм для оценки степени экстрагирования каротиноидов. По окончании экстракции отделить экстракт каротиноидов от плотного остатка путем фильтрации под вакуумом или центрифугирования.

Результаты измерения оптической плотности занести в таблицу 6.3.

На основании анализа данных таблицы 6.3 сделать вывод о параметрах (экстрагент, целесообразность введения органических кислот, температура), позволяющих наиболее эффективно извлекать каротиноиды из тканей гидробионтов.

Осадок высушить при комнатной температуре и взвесить. Рассчитать массовый выход каротиноидов (%) по отношению к исходному сырью по формуле (6.1). Расчетные данные занести в таблицу 6.4.

Сопоставить между собой значения массового выхода каротиноидов, полученных из гидробионтов животного и растительного происхождения.

Сформулировать вывод о возможных направлениях использования полученных экстрактов каротиноидов в производстве биологически активных добавок и композиций.



Таблица 6.4 – Результаты расчета выхода каротиноидов, извлеченных из тканей гидробионтов разными экстрагентами с добавлением органических кислот

Наименование гидробионта	Выход каротиноидов, %, при использовании разных экстрагентов и различных температурных режимах																	
	ацетон + 5 %-ная лимонная кислота			ацетон + 5 %-ная яблочная кислота			подсолнечное масло + 5 %-ная лимонная кислота			подсолнечное масло + 5 %-ная яблочная кислота			50 %-ный пропиленгликоль + 5 %-ная лимонная кислота			50 %-ный пропиленгликоль + 5 %-ная яблочная кислота		
	25 °C	40 °C	60 °C	25 °C	40 °C	60 °C	25 °C	40 °C	60 °C	25 °C	40 °C	60 °C	25 °C	40 °C	60 °C	25 °C	40 °C	60 °C
панцири ракообразных																		
мясо криля																		
хребты лососевых рыб																		
красные водоросли																		

#### **4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Дайте определение каротиноидов и ксантофиллов.
2. Какие каротиноиды наиболее распространены в тканях гидробионтов?
3. Какие функции выполняют каротиноиды в организме?
4. Какие вы знаете БАД на основе каротиноидов?

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ БАД МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СИНТЕЗОМ (ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ РАБОТА)

## 1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по поиску в базах данных и подбору микроорганизмов – продуцентов компонентов БАД, а также подбору составов питательных сред и параметров культивирования продуцентов.

## 2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- ознакомиться с теоретическим материалом относительно получения витаминов микробиологическим синтезом; заполнить таблицу, содержащую сведения о продуцентах витаминов, составе питательных сред, параметрах культивирования, способах выделения и очистки целевого продукта (п. 3.1);
- ознакомиться с теоретическим материалом относительно получения аминокислот микробиологическим синтезом; заполнить таблицу, содержащую сведения о продуцентах аминокислот, составе питательных сред, параметрах культивирования, способах выделения и очистки целевого продукта (п. 3.2);
- ознакомиться с теоретическим материалом относительно получения липидов из биомассы микроводорослей; заполнить таблицу, содержащую сведения о микроводорослях-продуцентах липидов, составе питательных сред, параметрах культивирования, способах выделения и очистки целевого продукта (п. 3.3);
- сформулировать рекомендации по возможным направлениям использования витаминов, аминокислот и липидов, полученных микробиологическим синтезом, в производстве БАД и БАК, определить направленность предлагаемых БАВ и БАК.

## 3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

**Материалы:** источники литературы (научные статьи, монографии, диссертации, учебные пособия, патенты на изобретения), информационно-коммуникационная сеть Интернет.

**Оборудование, базы данных:** персональный компьютер, БД ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт», БД Scopus, БД Web of science, БД elibrary, БД Коллекция микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН, БД Коллекция

автотрофных организмов ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина» РАН, БД disserCat, БД Академия Google, БД NCBI.

### **3.1 Изучение особенностей получения витаминов микробиологическим синтезом, поиск продуцентов витаминов в базах данных**

В последние несколько десятилетий синтез биологически активных соединений для потенциального применения в медицине, фармацевтике, пищевой промышленности стал актуальной научной задачей. Сегодня не только стало желательным найти новые пути синтеза для БАВ, но и сделать упор на поиск путей с минимальным вредным воздействием на окружающую среду.

Для синтеза витаминов могут быть применены как химические, так и микробиологические методы (микробный синтез, биосинтез). Применение микробного синтеза предпочтительнее химического способа ввиду ряда очевидных причин:

- ✓ простота организации генома микроорганизмов;
- ✓ легкая приспособляемость (лабильность) микробной клетки к среде обитания в естественных и искусственных условиях;
- ✓ достаточно высокие скорости протекания ферментативных реакций и нарастания клеточной массы при низких температурах (20–60 °С);
- ✓ возможность использования недефицитного, дешевого сырья (отходы промышленности, сточные воды).

Химический способ получения витаминов характеризуется такими недостатками, как многостадийность, необходимость тщательной очистки БАВ от посторонних примесей, высокая стоимость продуктов синтеза.

Для  $\beta$ -каротина (провитамина А), рибофлавина (В<sub>2</sub>), цианокобаламина (В<sub>12</sub>), аскорбиновой кислоты (С) разработаны технологии промышленного получения микробным синтезом.

Ознакомившись с теоретическим материалом в приложении к настоящему учебно-методическому пособию, а также с другими литературными источниками и базами данных (например, БД ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт», <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/>, <https://propionix.ru/sintez-vitaminov>), заполнить таблицу 7.1.

Таблица 7.1 – Сведения о технологиях промышленного получения витаминов микробным синтезом

Витамин	Продуцент, номер в БД	Состав питательной среды	Параметры культивирования	Способы выделения и очистки целевого продукта
β-каротин				
В <sub>2</sub>				
В <sub>12</sub>				
С				
.....				

На основании информации, указанной в таблице 7.1, сделать вывод о наиболее экономически целесообразной технологии микробиологического получения витаминов с учетом состава питательной среды, параметров культивирования штаммов-продуцентов (продолжительность, температура), способов выделения и очистки целевых продуктов.

### 3.2 Изучение особенностей получения аминокислот микробиологическим синтезом, поиск продуцентов аминокислот в базах данных

Для промышленного получения аминокислот могут быть использованы три метода: химический синтез (позволяет получить рацемат – продукт, представляющий собой смесь аминокислот L- и D-формы); гидролиз природных белков (требуется многостадийная очистка); биотехнологический способ (энзиматический и ферментативный синтез). Наиболее распространенным способом является биосинтез.

Продуцентами аминокислот в биосинтезе наиболее часто служат бактерии, относящиеся к родам *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Escherishia*. Субстратом при производстве аминокислот является углеводное сырье (меласса, гидролизаты крахмала и целлюлозы), этанол, уксусная или другие органические кислоты, а также углеводороды. В качестве источника азота используют соли аммония, нитраты, а также аминокислоты.

Ознакомившись с теоретическим материалом в приложении к настоящему учебно-методическому пособию, а также с другими литературными источниками и базами данных (например, БД ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт», <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/>, <https://propionix.ru/biosintez-aminokislot>), заполнить таблицу 7.2.

Таблица 7.2 – Сведения о технологиях промышленного получения аминокислот микробным синтезом

Аминокислота	Продуцент, номер в БД	Состав питательной среды	Параметры культивирования	Способы выделения и очистки целевого продукта
Метионин				
Лизин				
Треонин				
Фенилаланин				
Аспарагиновая кислота				
.....				

На основании информации, указанной в таблице 7.2, сделать вывод о наиболее экономически целесообразной технологии микробиологического получения аминокислот с учетом состава питательной среды, параметров культивирования штаммов-продуцентов (продолжительность, температура), способов выделения и очистки целевых продуктов.

### 3.3 Изучение особенностей получения полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) из биомассы микроводорослей, поиск продуцентов ПНЖК в базах данных

Конкурентоспособными продуцентами  $\omega$ -3 полиненасыщенных жирных кислот являются микроводоросли (в частности, *Chlorella vulgaris*, *Eustigmatos polyphem*, *Eustigmatos magnus*, *Eustigmatos vischeri*, *Vischeria helvetica*).

Ознакомившись с теоретическим материалом в приложении к настоящему учебно-методическому пособию, а также с другими литературными источниками и базами данных (например, БД Коллекция микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН, <https://ippras.ru/institut/unikalnye-nauchnye-ustanovki-unu-kolleksii/kolleksiya-mikrovodorosley-i-tsianobakteriy-ippas-ifr-ran-unu-kmts-ippas-ifr-ran>, БД Коллекция автотрофных организмов ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина» РАН, <https://ibiw.ru/index.php?p=collect>), заполнить таблицу 7.3.

Таблица 7.3 – Сведения о технологиях промышленного получения ПНЖК из биомассы микроводорослей

ПНЖК	Продуцент, номер в БД	Состав питательной среды	Параметры культивирования	Способы выделения и очистки целевого продукта

На основании информации, указанной в таблице 7.3, сделать вывод о наиболее экономически целесообразной технологии микробиологического получения ПНЖК с учетом состава питательной среды, параметров культивирования штаммов-продуцентов (продолжительность, температура), способов выделения и очистки целевых продуктов.

Сформулировать рекомендации по возможным направлениям использования витаминов, аминокислот и липидов, полученных микробиологическим синтезом, в производстве БАД и БАК, определить направленность предлагаемых БАВ и БАК.

#### 4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите основные технологические стадии микробиологического синтеза БАВ.
2. Дайте определение стерилизации, опишите виды стерилизации.
3. Какие требования предъявляются к штаммам – продуцентам БАВ?
4. Какими способами можно выделить целевой продукт из культуральной жидкости и биомассы микроорганизмов?
5. Какие микроорганизмы используются для промышленного получения витамина В<sub>2</sub>? Опишите технологические схемы получения витамина В<sub>2</sub>.
6. Какие микроорганизмы используются для промышленного получения витамина В<sub>12</sub>? Опишите технологические схемы получения витамина В<sub>12</sub>.
7. Какие методы используются в промышленности для получения витамина С.
8. В чем отличие энзиматического способа получения аминокислот от ферментативного синтеза?
9. Опишите общую схему получения аминокислот биотехнологическим методом.
10. Опишите особенности микробиологического синтеза метионина, лизина, треонина, аспарагиновой кислоты, фенилаланина.
11. Какие виды микроводорослей являются перспективными для биосинтеза ПНЖК?
12. Опишите схему комплексной переработки биомассы *Chlorella vulgaris*.
13. Какие базы данных могут быть использованы для поиска микроорганизмов – продуцентов витаминов, аминокислот, ПНЖК?

# Приложение ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

## Теоретический материал к лабораторной работе №1

Все методы разделения смесей белков основаны на том, что разделяемые компоненты в результате каких-либо манипуляций оказываются в разных участках системы и могут быть механически отделены друг от друга.

Выделение индивидуальных белков является ступенчатым процессом, так как на первых этапах очистки фракции содержат множество примесей, на каждой ступени разделения должна получаться фракция, более богатая необходимым веществом, чем предыдущая. Такой процесс часто называют фракционированием.

Методы разделения белков:

1. *Осаждение*. Для осаждения необходимо понизить каким-либо способом растворимость белка (рисунок П.1). Растворимость белков зависит от их способности к гидратации. В дистиллированной воде белки чаще всего растворяются слабо, но их растворимость возрастает по мере увеличения ионной силы (концентрации соли в среде). При этом все большее количество гидратированных неорганических ионов (рисунок П.1, гидратная оболочка) связывается с поверхностью белка и, тем самым, уменьшается степень его агрегации (засаливание). При высокой ионной силе молекулы белков лишаются гидратирующих оболочек, что приводит к агрегации и выпадению в осадок (*высаливание*). Используя различие в растворимости, можно с помощью обычных солей, например, сульфата аммония, разделить, т.е. фракционировать смесь белков.

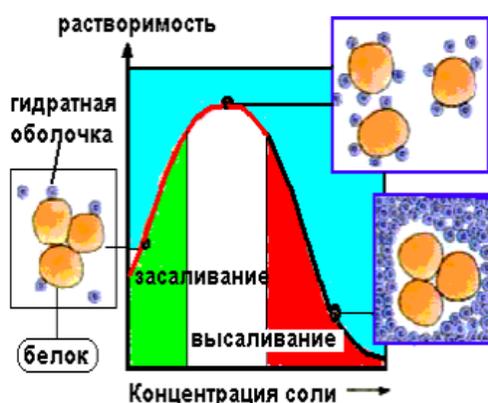


Рисунок П.1 – Схема высаливания белков

Принцип этого метода осаждения белков высаливанием основан на том, что при повышении концентрации соли в растворе происходит сжатие ионных атмосфер, образуемых противоионами белка, что способствует сближению их до критического расстояния, на котором межмолекулярные силы Ван-дер-

Ваальсова притяжения перевешивают кулоновские силы отталкивания. Это приводит к слипанию белковых частиц и их выпадению в осадок.

2. *Изоэлектрическое осаждение.* Заряд белков обусловлен в первую очередь остатками аспартата и глутамата («-» заряд), а также остатками лизина и аргинина («+» заряд). По мере повышения рН заряд белков проходит от положительных к отрицательным значениям и в изоэлектрической точке оказывается равен нулю. Изоэлектрическая точка – это значение рН, при котором суммарный заряд белка равен нулю. В результате белок лишается своей ионной атмосферы, и его частицы слипаются, выпадая в осадок.

3. *Центрифугирование.* Выпавший осадок белка можно выделить фильтрованием. Для этого часто пользуются центрифугами. Частицы осажденного вещества под действием центробежной силы оседают на дне центрифужных стаканов (пробирок) и сжимаются в плотный осадок, с которого оставшийся раствор (надосадочная жидкость, или супернатант) легко сливается или удаляется при вакуумном фильтровании. Скоростные центрифуги (ультрацентрифуги) создают центробежное ускорение порядка 105g (т.е. 105 ускорений свободного падения), что позволяет осаждать даже некоторые крупные надмолекулярные агрегаты-вирусы.

4. *Ситовой эффект.* Молекулярные сита представляют собой материалы с очень маленькими порами определенного размера. Следует отметить особенности этих «сит»: крупные частицы не остаются на поверхности материала сита, а обтекают его частички (гранулы), тогда как мелкие вещества примесей диффундируют в частицы сита и задерживаются [1, 2].

Материалом для молекулярных сит может служить сефадекс (полисахарид декстран, у которого после соответствующей обработки цепи оказываются сшитыми трехуглеродными мостиками).

В перечисленных методах в конечной смеси остаются низкомолекулярные вещества – органические растворители, соли и кислоты.

Для отделения низкомолекулярных примесей или замены состава среды используют *диализ*. Диализ основан на применении мембран, проницаемых для воды и низкомолекулярных веществ и непроницаемых для белков (полупроницаемые мембраны). Чаще всего используют пленки из целлофана (нитрат целлюлозы).

Подлежащий диализу раствор белка помещают в мешок из целлофана и погружают последний в сосуд с водой (рисунок П.2). Непрерывный ток воды через сосуд приводит к полному переходу в него всех проходящих через целлофан веществ, а белки остаются внутри.

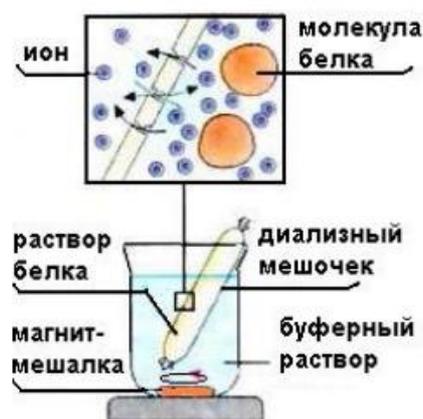


Рисунок П.2 – Схема диализа

Информация относительно биологической активности нативной конформации полипептидной цепи закодирована в аминокислотной последовательности. Вторичные, третичные и четвертичные структуры многих белков образуются в растворе самопроизвольно в пределах нескольких минут. Свертывание полипептидной цепи в нативную конформацию (фолдинг) и существование белковой молекулы наиболее успешно происходит в физиологических условиях. Потеря нативной конформации (денатурация) наступает при экстремальных значениях рН, высокой температуре, под действием высоких концентраций солей, органических растворителей и других денатурирующих веществ. Эти особенности используются и для очистки белков.

*Химические свойства белков.* Обладая многочисленными боковыми радикалами аминокислот различной химической природы, белковые молекулы способны давать широкий круг реакций. Особо важную роль в обеспечении определенных структурных особенностей белков и ряда их биологических свойств имеют реакции между радикалами аминокислотных остатков в пределах одной и той же молекулы. При этом выявляется зависимость третичной структуры от ряда внешних условий: рН, концентрации солей в растворе, окислительно-восстановительного режима клетки и др.

К *физическим свойствам* относят молекулярную массу, двойное лучепреломление, подвижность в электрическом поле. Помимо этого, для белков характерны оптические свойства, заключающиеся в способности вращать плоскость поляризации света (оптическая активность), рассеивать световые лучи ввиду значительных размеров белковых частиц и поглощать ультрафиолетовые лучи. Оптические свойства используют при количественном определении белков, измерении молекулярной массы и т.п. Одним из характерных физических свойств белков является их способность адсорбировать на поверхности молекул низкомолекулярные органические соединения и ионы. Благодаря этому белки

выполняют в организме транспортную функцию, также это может быть использовано при их осаждении [3].

## Теоретический материал к лабораторной работе №2

Мёд представляет собой сладкий, густой, вязкий продукт, вырабатываемый пчёлами и родственными насекомыми. Пчелиный мёд представляет собой частично переваренный в зобе медоносной пчелы (*Apis mellifera*) нектар либо сахаристые выделения некоторых растений или некоторых питающихся соками растений насекомых.

Мёд содержит 13-22 % воды, 75-80 % углеводов (глюкоза, фруктоза, сахароза), а также в незначительных количествах витамины В1, В2, В6, Е, К, С, каротин (провитамин витамина А), фолиевую кислоту.

Существуют различные классификации натурального меда:

- по происхождению (ботаническому и географическому);
- по консистенции (густоте);
- по товарному виду;
- по цвету и прозрачности;
- по вкусу и запаху.

По происхождению натуральный мёд может быть цветочный и падевый. *Цветочный мёд* производится пчёлами в процессе сбора и переработки нектара, выделяемого нектарниками цветковых растений. *Падевый мёд* пчёлы вырабатывают, собирая падь (сладкие выделения тли и некоторых других насекомых) и медвяную росу (выпот сахаристого сока на листьях некоторых растений и на еловой хвое) с листьев или стеблей растений. Падевый мёд содержит повышенное количество минеральных веществ.

В зависимости от медоносного растения, нектар которого был собран пчёлами, мёд различается по цвету, вкусу и запаху.

Если мёд получен с одного определённого вида растения, то его называют *монофлорным*, обычно ему придают название этого растения – например, липовый, кипрейный, гречишный, подсолнечниковый. Если пчёлы собрали нектар с разных растений, то такой мёд обычно называют *полифлорным (смешанным)*, или просто цветочным.

Получить мёд с одного медоносного растения практически невозможно – рядом с пасекой обычно одновременно цветёт несколько медоносов, а при откачке вместе со свежим мёдом могут попадать старые запасы пчелиной семьи, собранные ранее с других растений.

Наиболее известные виды меда по медоносам: авокадовый, апельсиновый, вересковый, гречишный, донниковый, клеверный, кипрейный, мелиссовый, липовый, розмариновый, эвкалиптовый, мятный, морковный [4].

Менее точные, но достаточно популярные, названия видов мёда могут происходить по тому угодию, с которого мёд собран пчёлами: луговой, полевой, степной, лесной, горный, плавневый, таежный.

Нередко мёд называют и по географической местности, связанной с его происхождением. Так, в России известны:

- ✓ башкирский мед,
- ✓ сибирский кипрейный мед,
- ✓ алтайский мед
- ✓ дальневосточный липовый мед.

По консистенции, центробежный мёд может быть жидким или закристаллизовавшимся («севшим»).

*Жидкий мёд* – нормальное состояние свежего мёда после откачки из сот (обычно мёд текущего пчеловодного сезона). Жидкий мёд имеет разную степень густоты (вязкости). Вязкость мёда зависит от большего или меньшего содержания в нём воды и отчасти от температуры окружающего воздуха. Жидкий мёд может получаться также нагреванием закристаллизовавшегося мёда, при этом могут теряться некоторые полезные свойства мёда, а также увеличивается содержание в нём оксиметилфурфура. Слишком жидкий мёд может свидетельствовать о недостаточной выдержке его в сотах, его называют «незрелым».

*Закристаллизовавшийся («севший») мёд* образуется естественным путём из жидкого мёда. Мёд с цветов одуванчика «садится» наиболее быстро (примерно от 2-3 дней до 1 недели), разнотравье (в зависимости от медоносов, с которых он был собран) «садится» через два-три месяца после откачивания из сот. Севший мёд не теряет своих свойств в результате кристаллизации. В севшем мёде в зависимости от величины кристаллов различают крупнозернистую, мелкозернистую и салообразную садку. В крупнозернистом мёде сростки кристаллов сахара бывают более 0,5 мм в диаметре, в мелкозернистом – менее 0,5 мм, но ещё различимы невооружённым глазом. Иногда закристаллизовавшийся мёд имеет настолько мелкие кристаллы, что масса мёда кажется однородной, салообразной.

По цвету мёд делят на:

- светлый,
- тёмный с многочисленными переходными оттенками от белого до красновато-коричневого.

Цвет зависит от растений, из нектара которых получен мёд: относительно светлые виды мёда получают из соцветий липы, подсолнечника, акации, относительно тёмные – из гречихи, молочая.

Прозрачность жидкого мёда зависит от количества попавшей в мёд при откачке перги (пыльца-обножка, собранная пчёлами с цветков растений, сложенная и утрамбованная в соты, залитая сверху мёдом.). Мёд может мутнеть и в результате начавшегося процесса его кристаллизации.

Натуральный мёд, как правило, имеет сладкий вкус. Резкий кисловатый привкус присущ только испорченному, забродившему мёду.

Аромат (запах) мёда обуславливается особенностями того или иного растения. Мёд, собранный пчёлами с одного определённого растения, имеет обычно свой характерный вкус и аромат. При известном опыте можно, например, безошибочно определить гречишный мёд. Своеобразный аромат имеет мёд липовый, бодяковый, собранный с цветков подсолнечника. Аромат смешанного мёда отличается чрезвычайным разнообразием и часто не даёт возможности определить его происхождение.

Для получения желаемого цвета и аромата разные виды мёда могут смешиваться. Путём взбивания из мёда получают крем-мёд, не подверженный засахариванию [5].

Согласно ГОСТ 19792-2017, контроль качества меда проводится по таким показателям, как:

- внешний вид (консистенция) – жидкий, частично или полностью закристаллизованный,
- аромат – приятный, от слабого до сильного, без посторонних запахов,
- вкус – сладкий, приятный, без постороннего привкуса,
- массовая доля воды – не более 20 %,
- массовая доля редуцирующих сахаров – не менее 65 %,
- массовая доля глюкозы и фруктозы (суммарно) – не менее 60 % (для цветочного меда) и не менее 45 %; (для падевого и смешанного меда),
- массовая доля сахарозы – не более 5 % (для цветочного меда), не более 10 % (для меда с белой акации), не более 15 % (для падевого и смешанного меда),
- диастазное число – не менее 8 ед. Готе,
- массовая доля гидроксиметилфурфурола (ГМФ) – не более 25 мг/кг,
- качественная реакция на ГМФ – отрицательная,
- механические примеси – не допускаются,
- признаки брожения – не допускаются.

*Аромат меда.* Цветочный мёд имеет специфический, свойственный ему аромат – слабый или хорошо выраженный. Он зависит от наличия в нем тех

эфирных масел, которые содержатся в нектаре. Сотовый мёд имеет ярко выраженный аромат, а при выкачивании мёда на центрифугах и при последующей его обработке теряется большое количество ароматических веществ. Особенно много эфирных масел испаряется при нагревании мёда. При неправильном нагревании меда наступает карамелизация углеводов, и мёд приобретает запах жженого сахара. Эти показатели должны учитываться при оценке качества мёда. Способ и период хранения также отражаются на аромате мёда. Неблагоприятные условия и длительность хранения ослабляют аромат. При брожении появляется несвойственный мёду запах, неприятный кисловатый или даже кислый. Оценку аромата мёда рекомендуется проводить дважды: до определения его вкуса и во время пробы на вкус, так как аромат больше ощущается при медленном растворении его во рту. Для лучшего определения аромата мёд рекомендуется нагреть. При этом ароматические вещества испаряются быстрее.

*Вкус меда.* Основная составная часть пчелиного мёда – глюкоза и фруктоза, поэтому при сенсорном определении ощущается сладкий вкус, который считается главным его достоинством. Большинство сортов мёда имеет своеобразный привкус, зависящий от преобладания нектара определенных медоносов. Натуральный цветочный мёд всех сортов имеет сладкий вкус и оказывает раздражающее действие на слизистую оболочку – ощущается терпкость разной интенсивности. Этими свойствами не обладает искусственно инвертированный сахар, сахарный мёд. Привкус мёда может быть обусловлен рядом факторов. В частности, нагревание мёда выше 75 °С придает ему вкус жженого сахара. При сборе незрелого мёда и неправильном его хранении может наступить брожение мёда, вследствие этого он будет иметь кисловатый или кислый вкус. Неприятный вкус может быть обусловлен наличием в цветочном мёде определенного количества пади или других веществ, иногда собираемых пчелами вместе с сахаросодержащими продуктами. По стандарту мёд должен быть сладким, приятным на вкус. Не допускаются посторонние привкусы: горький, кислый, карамелизованный, плесневелый и др.

*Консистенция меда.* По консистенции судят о зрелости мёда и его влажности. Она зависит от химического состава мёда, температуры окружающей среды, сроков и способов хранения. От свойств моносахаридов – глюкозы и фруктозы – зависит в основном консистенция мёда, его кристаллизация, гигроскопичность и т. д. Свежевыкачанный мёд имеет жидкую консистенцию или он может быть, в виде густой однородной сиропообразной массы. Через один – два месяца он кристаллизуется и становится более плотным. При этом из глюкозы образуются кристаллы, а фруктоза остается в жидком состоянии и обволакивает кристаллы. Вследствие этого, каким бы твердым мёд ни был, на разрезе имеет липкую поверхность. Кристаллы глюкозы соединяются друг с другом, образуя друзы (зерна или крупку).

Различают три вида кристаллизации:

1. салообразную, при которой невооруженным глазом кристаллы незаметны;
2. мелкозернистую с размером кристаллов до 0,5 мм;
3. крупнозернистую с зерном размером в диаметре больше 0,5 мм [6].

Крупнозернистый мед менее ценится, чем мелкозернистый. Свежевыкачанный мёд имеет так называемые зародышевые кристаллы глюкозы. От их количества зависит быстрота кристаллизации меда при хранении. Чем их больше, тем быстрее идет кристаллизация и мельче образуются зерна кристаллов. Перемешивание меда или добавление растертого засахаренного меда позволяет получать мелкозернистый мед. Меды гречишный, люцерновый, подсолнечниковый, хлопчатниковый и другие закристаллизовываются очень быстро, тогда как акациевый, шалфейный, вишневый и падевый – с деревьев лиственных пород – кристаллизуются медленно. Несколько своеобразно протекает кристаллизация в незрелом мёде, содержание воды в котором превышает норму. Это наблюдается в годы с прохладной и сырой погодой. В мёде образуется два слоя: верхний, более жидкий, и нижний плотный. В верхнем слое скапливается фруктоза, а в нижнем – глюкоза. В верхнем слое количество воды увеличивается до 50 %. Иногда наблюдается расслаивание зрелого мёда при хранении его в герметически закрытой таре (бидоны, молочные фляги), что считается с гигиенической точки зрения нормальным процессом [7].

### Теоретический материал к лабораторной работе №3

К продуктам пчеловодства относятся прополис, маточное молочко, пчелиный воск и пыльца (перга).

**Прополис** – это смолистое вещество от коричневого до тёмно-зелёного цвета, используемое пчёлами для замазывания щелей, регулирования проходимости летка, дезинфекции ячеек сот перед засевом яиц маткой, а также изоляции посторонних предметов в улье. По внешнему виду прополис – это смолистая аморфная масса или крошка, неоднородная по структуре. Цвет зависит от географического происхождения и места отложения в улье, от загрязненности и срока хранения и изменяется от серого до буро-зеленого. Запах прополиса напоминает пряный аромат растительных смол и эфирных масел или может отсутствовать вовсе. Вкус – горький, жгучий, вяжущий. Консистенция зависит от температуры. Ниже 15 °С прополис – твердое, хрупкое, легко крошащееся тело. При 20...30 °С и выше прополис становится мягким и пластичным.

Примерный химический состав прополиса представлен растительными смолами (от 38 до 60 %), которые состоят из смеси органических, в том числе ненасыщенных, кислот. В составе прополиса обнаружены бальзамы (от 3 до 30

%) – сложные смеси дубильных веществ, смолистых компонентов, эфирных масел, фенолосоединений и ароматических альдегидов.

Дубильные вещества представляют собой фракцию желтого, оранжевого или светло-коричневого цвета, эфирные масла – бледно-желтую, прозрачную массу с сильным ароматом и горьким вкусом. Воска в прополисе от 7,8 до 36 % в зависимости от места отложения пчелиного клея. Из флавоноидов найдены акацетин, рамкоцитрин, хризин и др. (всего 19). Из витаминов обнаружены тиамин, рибофлавин, никотиновая и аскорбиновая кислоты, токоферол. Из органических кислот – коричная, кофейная, кумаровая, бензойная. Найдены ванилин, коричный спирт. Зольные элементы представлены калием, натрием, магнием, кремнием, стронцием и др. (всего 14).

Состав и химические константы экстрактов прополиса зависят от вида растворителя, условий экстракции и способа удаления растворителя [8].

Показатели качества прополиса регламентируются ГОСТ 28886–2019 (таблица П.1).

Таблица П.1 – Органолептические и физико-химические показатели прополиса (согласно ГОСТ 28886–2019)

Наименование показателя	Значение показателя
Внешний вид	Комки, крошки или брикеты
Цвет	Темно-зеленый, бурый или серый с зеленоватым, желтым или коричневым оттенками
Запах	Характерный смолистый (смесь запахов меда, душистых трав, хвои, тополя)
Консистенция	Плотная, в изломе неоднородная
Структура	Вязкая – при 20 °С–40 °С, твердая – ниже 20 °С
Вкус	Горький, слегка жгучий
Окисляемость, с, не более	22,0
Массовая доля механических примесей, %, не более	20,0
Массовая доля воска, %, не более	25,0
Массовая доля флавоноидных и других фенольных соединений, %, не менее	25,0
Полифенольные соединения, мг/г, не менее	10,0
Йодное число, %, не менее	35,0
Количество окисляемых веществ в 1 см <sup>3</sup> раствора окислителя на 1 мг прополиса, см <sup>3</sup> /мг, не менее	0,5

Биологическая активность прополиса определяется взаимодействием всех входящих в его состав компонентов. Прополис может применяться как анти-микробное, противовирусное, противопаразитарное, антикоагуляционное, противогрибковое, радиопротекторное, иммуностимулирующее, анестезирующее, антиоксидантное, консервирующее и дезодорирующее средство.

Важным свойством прополиса является его губительное действие на возбудителя туберкулеза (микобактерии), причем наиболее сильное именно на возбудителя человеческого типа.

В отличие от последних прополис не вызывает устойчивости микроорганизмов, не влияет на состав кишечной микрофлоры и при продолжительном применении внутрь не приводит к дисбактериозу. При совместном назначении с антибиотиками (пенициллином, стрептомицином, тетрациклином, неомицином, мономицином, олеандомицином, полимиксином) он повышает их эффективность и продолжительность действия.

Прополис входит в состав таких лекарственных препаратов, как пропогелиант, мипропол, пропофаренгит, антиэкзим, флорал, прополан, пропоцеум, мелпросепт, пропосепт, продерм [9].

**Маточное молочко (апилактоза)** – специальный корм, который используют медоносные пчелы для кормления маточных личинок на всех стадиях развития, пчелиная матка питается маточным молочком на протяжении всей своей жизни. Вырабатывается маточное молочко у пчёл-кормилиц в верхнечелюстной железе, их ещё называют аллотрофическими железами. Получают маточное молочко извлечением из маточников или специальных искусственных мисочек.

Маточное молочко содержит 34 % (30-40%) сухих веществ и 66 % (60-70%) воды. Протеины (14–18%) представлены ферментами, липопротеидами, альбуминами, глобулинами и другими белковыми веществами (количество белков составляет около 50 %), а также небелковыми веществами (пептиды, аминокислоты). По содержанию аминокислот (аланин, лизин, метионин, валин) маточное молочко, продуцируемое пчелами разных рас, а также из маточников и пчелиных ячеек, различно.

Углеводы представлены глюкозой, фруктозой, сахарозой, мальтозой, рибозой и другими сахарами, содержание которых составляет от 9-15 до 20 %. Липиды (жирные кислоты, насыщенные и ненасыщенные моно- и дикарбоновые, в том числе деценовая, янтарная, адениновая, пальмитиновая, лауриновая и др.) составляют от 1,5 до 7 %. Маточное молочко содержит до 1,2% зольных элементов, богато витаминами группы В (тиамин, рибофлавин и др.), содержит пантотеновую и аскорбиновую кислоты. В составе маточного молочка обнаружены нуклеотиды (аденин, урицил), нуклеиновые кислоты, ацетилхолин, стеролы, молочная и пировиноградная кислоты и минеральные вещества [10].

Показатели качества маточного молочка регламентируются ГОСТ 28888–2017 (таблица П.2).

Таблица П.2 – Органолептические и физико-химические показатели пчелиного маточного молочка (согласно ГОСТ 28888–2017)

Наименование показателя	Значение показателя
Внешний вид	Однородная, непрозрачная масса
Цвет	Белый с желтоватым оттенком или слабо-кремовый
Консистенция	Сметанообразная
Механические примеси (личинки, ульевого сор)	Не допускаются
Запах	Приятный, с медовым оттенком
Массовая доля сухих веществ, %	30,0–37,0
Вкус	Вяжущий, жгучий
Показатель окисляемости (подлинности), с, не более	10,0
Водородный показатель (рН) водного раствора маточного молочка массовой долей 1 %, ед. рН	3,5–4,5
Массовая доля деценовых кислот, %, не менее	5,0
Массовая доля: - восстанавливающих сахаров (до инверсии), %, не менее - сахарозы, %, не более	20,0 10,5
Флюоресценция	Светло-голубая
Массовая доля сырого протеина, %	31,0–47,0
Массовая доля воска, %, не более	2,0
Признаки брожения	Не допускаются

Химический состав маточного молочка определяет его целебные свойства, его биологически активные вещества повышают тонус, работоспособность человека, стимулируют деятельность центральной нервной системы, регулируют обмен липидов и холестерина, нормализуют кровяное давление. Маточное молочко задерживает рост кишечной палочки, золотистого стафилококка, сальмонелл, возбудителя сибирской язвы, а в разбавленном виде способствует развитию этих микроорганизмов. Малые дозы стимулируют, а большие угнетают обменные процессы, центральную нервную систему, тканевое дыхание, окислительное фосфорилирование [11].

**Перга** – пыльца-обножка, собранная пчёлами с цветков растений, сложенная и утрамбованная в соты, залитая сверху мёдом.

Большинство аналитических данных показывают, что белка в перге содержится около 20 %, жиров от 1,3 до 14 %. Из 12 жирных кислот с длиной углеродной цепи от 12 до 22 атомов углерода больше всего содержится пальмитиновой и линоленовой кислот. Углеводы составляют от 25 до 38 %, минеральные соли – от 0,9 до 5 %. Кислотность водного раствора перги рН 4,3, накопление молочной кислоты повышает активную кислотность перги по сравнению с обножкой на 40–46 %, что вызвано размножением молочнокислых бактерий при повышенной температуре в анаэробных условиях.

Из витаминов наибольшее содержание отмечено для каротиноидов, которые могут полностью обеспечить суточную потребность человека в провитаминах А. Сравнительно много витамина С (до 38 % суточной нормы в 20 г перги) и витамина В6 (до 57 %). Другие витамины присутствуют в меньших количествах (до 10-30 % суточной нормы в 20 г перги).

Показатели качества перги регламентируются ГОСТ 31776–2012 (таблица П.3).

Таблица П.3 – Органолептические и физико-химические показатели перги (согласно ГОСТ 31776–2012)

Наименование показателя	Значение показателя
Внешний вид	Мелкие неравномерные комочки
Цвет	От темно-желтого до коричневого
Поражение восковой молью	Не допускается
Механические примеси	Не допускаются
Запах	Характерный, медово-пыльцевой
Вкус	Кисло-сладкий, слегка горьковатый
Массовая доля воды, %, не более	18,0
Окисляемость, %, не более	23,0
рН водного раствора с массовой долей 2 %	3,0
Массовая доля флавоноидных соединений (в пересчете на рутин), %, не менее	0,5
Массовая доля сырого протеина, %, не менее	18,0
Массовая доля воска, %, не более	5,0

Перга официально признана функциональным продуктом питания, пищевой добавкой при смешивании с другими продуктами пчеловодства или растительными компонентами, лечебно-профилактическим продуктом (заболевания печени, сердца, сердечно-сосудистой и нервной системы) и косметическим средством (при использовании масок для лица), что зафиксировано в докумен-

те, представленном и одобренном на Международном конгрессе по апитерапии в Японии в 2006 г.

Перга содержит уникальные комплексы витаминов и микроэлементов в полностью усваиваемой форме, уже сбалансированные по потребностям человеческого организма, полный набор незаменимых аминокислот, а также ряд ферментов и других биологически активных веществ как общеоздоровительного, так и направленного действия. Перга обладает разносторонним действием: повышает общую устойчивость и функциональную активность организма. Благоприятно влияет на систему кроветворения, оказывает нормализующее действие при отравлении химическими веществами. Перга является биостимулятором, который обладает тонизирующим, трофическим, антисептическим действием, повышает аппетит, уменьшает вялость, улучшает тонус, обмен веществ. Это хороший адаптоген: повышает защитные силы организма и его работоспособность, снижает утомление, смягчает действие стресс-факторов.

Кроме этого, перга рекомендуется при гепатитах, гастритах, колитах, язве желудка и двенадцатиперстной кишки, при очищении кишечника; при анемии, гриппе, псориазе, герпесе, инфарктах, инсультах, нейродермите, экземе, нарушении мозгового кровообращения, сердечной недостаточности, алкоголизме, наркомании, черепно-мозговых травмах, слабоумии, потере памяти, при патологии беременности, гинекологических заболеваниях [12, 13].

**Пчелиный воск** – смесь органических веществ, вырабатываемых восковыми железами медоносных пчёл для постройки сот. Представляет собой многокомпонентное твёрдое вещество от белого (с лёгким жёлтым оттенком) до жёлто-бурого цвета с характерным медовым запахом. Под действием солнечного света в тонких слоях пчелиный воск осветляется. При наличии примеси прополиса пчелиный воск может приобретать зеленоватый оттенок.

Пчелиный воск представляет собой сложную композицию из более чем 300 веществ, 111 из них были идентифицированы. Сложные эфиры (главным образом эфиры церилового, мелиссинового спиртов и соответствующих кислот) составляют от 70 до 75 % воска. Свободные жирные кислоты (лигноцериновая, церотиновая, мелиссиновая и др.) – от 12 до 15 %. Остальные компоненты воска (около 11%) представлены окси- и кетокислотами, углеводами парафинового ряда, одно- и двухатомными спиртами, минеральными веществами, смолами, растительными пигментами, ароматическими веществами, витаминами, холестерином, тритерпенами и другими веществами. В нем выделены и идентифицированы 11 белков, тритерпены (сквален и ланостерин), стеролы (холестерол и его эфиры) и субстанции, положительно влияющие на рост растений, такие как мирициловый спирт, гиббереллин и стероид рапсового масла. Пчелиный воск содержит небольшое количество воды (от 0,1 до 2,5 %) и каротиноидов (12,8 мг в 100 г воска) [14].

Показатели качества пчелиного воска регламентируются ГОСТ 21179–2000 (таблица П.4).

Таблица П.4 – Органолептические и физико-химические показатели пчелиного воска (согласно ГОСТ 21179–2000)

Наименование показателя	Значение показателя для воска	
	пасечного	производственного
Цвет	Белый, светло-желтый, желтый, темно-желтый, серый	Не темнее светло-коричневого
Запах	Естественный, восковой	Специфический
Структура в изломе	Однородная, мелкозернистая	
Массовая доля воды, %, не более	0,5	1,5
Массовая доля механических примесей, %, не более	0,3	
Глубина проникновения иглы при 20 °С, мм: определенная на пенетрометре определенная на приборе Вика ОГЦ-1	до 6,5 до 6,5	6,6–9,0 6,6–12,0
Наличие фальсифицирующих примесей	Не допускается	
Плотность при 20 °С воды, г/см <sup>3</sup>	0,95–0,97	
Показатель преломления при 75 °С	1,441–1,443	1,441–1,444
Температура плавления (каплепадения), °С	63,0–66,0	63,0–69,0
Кислотное число	16,0–20,0	17,0–21,0
Число омыления	85,0–101,0	
Эфирное число	67,0–84,0	71,0–83,0
Йодное число, г йода на 100 г воска	7,0–15,0	9,0–20,0
Отношение эфирного числа к кислотному числу	3,5–4,7	3,3–4,5

Основная часть получаемого воска применяется в пчеловодной отрасли для изготовления вошины. В настоящее время в качестве сырья воск используют около 40 отраслей промышленности. Он широко применяется в литейном деле, электротехнике, на железнодорожном транспорте, в текстильной, парфюмерной, авиационной, автомобильной, фармацевтической, полиграфической, лакокрасочной и многих других отраслях промышленности. Воск, в частности, входит в состав лыжной мази, мастики для прививки деревьев, сургуча, цемента для склеивания мрамора и гипса, карандашей для рисования на стекле и пр. Значительное место пчелиный воск занимает в медицине. Он входит в состав многих мазей, пластырей и лечебных свечей. Субстанции, растворенные или

закапсулированные в воск, медленно высвобождаются, и это свойство используют во многих лекарственных препаратах.

На его основе изготавливают различные пластыри (липкий, ртутный, мыльный), мази (восковая, спермацетовая, свинцовая, цинковая и др.). Он служит основой для многих фармацевтических препаратов. Противовоспалительные, антимикробные свойства воска, которые обусловлены, вероятно, включениями прополиса и других минорных ингредиентов, с эффектом используются при лечении заболеваний верхних дыхательных путей воспалительного характера.

Пчелиный воск используется в пищевой промышленности при изготовлении конфет. Нашел применение воск в косметической промышленности. Он входит в состав питательных, вяжущих, очищающих, отбеливающих кремов, масок для лица, в состав многих косметических препаратов [15].

#### Теоретический материал к лабораторной работе №4

Хитин ( $C_8H_{13}NO_5$ )<sub>n</sub> – структурный полисахарид, полимер из остатков N-ацетилглюкозамина, связанных между собой β-(1→4)-гликозидными связями. Распространённость хитина в природе – на втором месте среди биополимеров после целлюлозы. Хитозан представляет собой аминсахар, производное линейного полисахарида, макромолекулы состоят из случайно связанных β-(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамин, является деацетилированным хитином. Хитозан – катионный полисахарид основного характера [19]. Формула хитина представлена на рисунке П.3, формула хитозана – на рисунке П.4, реакция деацетилирования хитина – на рисунке П.5.

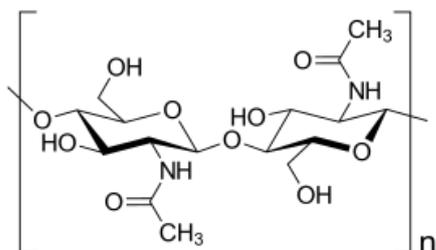


Рисунок П.3 – Формула хитина

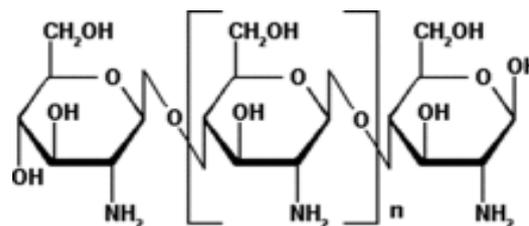


Рисунок П.4 – Формула хитозана

Хитин и хитозан находят широкое применение в различных областях промышленности:

1) Медицина:

- биологически активное вещество, стимулирующее восстановление соединительной ткани хрящей и суставов при профилактике и предупреждении артрита, артрозов, полиомиелита, ряда заболеваний опорно-двигательного аппарата и сердечно-сосудистой системы;

- средство для механической защиты ран и регенерации поврежденной ткани (заживление ран происходит в 3–4 раза быстрее);

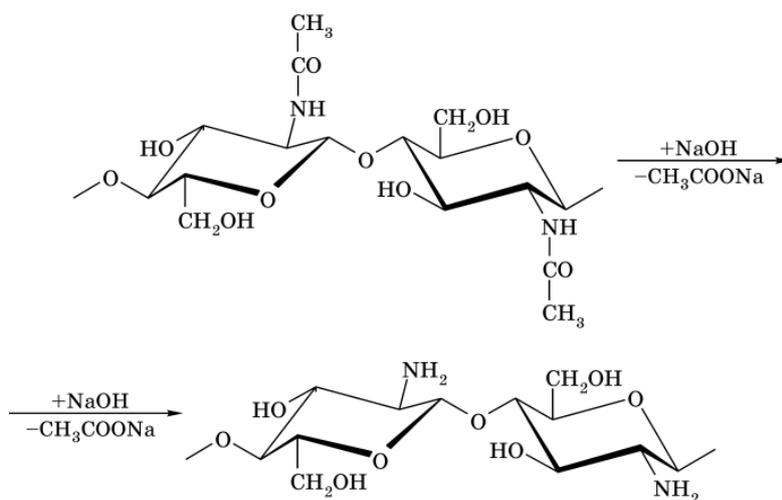


Рисунок П.5 – Деацетилирование хитина

- средство лечения и устранения поражений и ожогов слизистой оболочки полости рта и зубов;
- функциональный материал для создания мембран, обладающих адгезивными свойствами, а также пленок, наночастиц и наносистем для доставки витаминов, белков, пептидов и лекарственных средств (перорально, парентерально), и пролонгации их действия;
- радиопротектор при острой лучевой болезни;
- аналог гепарина, обладающий антикоагулянтной активностью и замедляющий свертывание крови, препятствующий возникновению тромбов.

## 2) Пищевая промышленность:

- эмульгатор, загуститель соусов, приправ, паштетов, паст; стабилизатор гомогенных и гетерогенных систем при производстве пудингов, муссов, желе;
- используется как коагулянт для осветления вин, пива, соков;
- образование защитных пленок на поверхности плодов и овощей;
- консервант, подавляющий условно-патогенную микрофлору и повышающий биологическую ценность продуктов питания и напитков;
- биологически активная добавка для связывания жиров и избыточного холестерина.

## 3) Парфюмерно-косметическая промышленность:

- компонент косметических кремов (образование защитной пленки на коже, снижающей потерю воды; повышение эффективности УФ-фильтров);

- средство по уходу за волосами (шампуни, бальзамы, лосьоны) – для улучшения расчесываемости и уменьшения статического заряда, предупреждения перхоти и обеспечения блеска волос;
- гелеобразователь в жидком мыле, гелевых зубных пастах (0,5–1,5 %), а также в лаках для ногтей с бактерицидными свойствами;
- стабилизатор аромата духов.

#### 4) Сельское хозяйство:

- улучшение почв в композициях с природными или искусственными удобрениями;
- скрепляющий материал при получении гранулированных удобрений;
- средство, повышающее устойчивость растений против различных заболеваний (бактериальных, грибковых, вирусных, нематод) при обработке семян до посева и обработке растений в фазу ветвления;
- стимулятор роста сельскохозяйственных растений.

#### 5) Экология:

- в качестве сорбентов для очистки сточных вод от различных видов загрязнителей.

#### 6) Биотехнология:

- при производстве лекарственных средств;
- в качестве иммобилизатора и стабилизатора ферментов и клеток;
- матрица для клеточных культур, выборочного восстановления генетически однородных белков и микрокапсуляции.

Существуют различные методы выделения хитина из сырья и его преобразования в хитозан. Наиболее часто используемыми являются химический, биотехнологический, электрохимический методы. Химический метод является одним из наиболее старых способов получения хитозана. Он основан на последовательной обработке сырья щелочами и кислотами. Процесс удаления белков (депротеинирование) осуществляют при помощи обработки размельченного хитинсодержащего сырья раствором щелочи. Как правило, применяется гидроксид натрия. Далее следует процесс деминерализации, который проводится в растворе соляной кислоты, до полного удаления минеральных солей из сырья. Процесс обесцвечивания (депигментации) проводят с использованием окислителей, например, перекиси водорода. Процесс деацетилирования производят путем нагревания сырья с концентрированным раствором щелочи. Полученный хитозан последовательно промывают водой и метанолом (рисунки П.6, П.7).

Другим способом получения хитина и его дальнейшего преобразования в хитозан является проведение сначала стадии деминерализации, а затем – стадии депотеинирования. Полученный по этой схеме продукт обладает более высоким качеством в сравнении с хитином, полученным по схеме депотеи-

нирование – деминерализация. К недостаткам химического способа получения хитина можно отнести большое количество отходов производства, контакт сырья с сильными реагентами, что приводит к деструкции хитина, гидролизу и химической модификации белка и липидов, и, как следствие, ухудшению качества целевых продуктов и уменьшению молекулярной массы хитозана. К достоинствам химического способа получения хитина относятся можно отнести высокую степень депротенирования и деминерализации хитина, небольшое время обработки сырья и относительную доступность, и дешевизну реагентов.

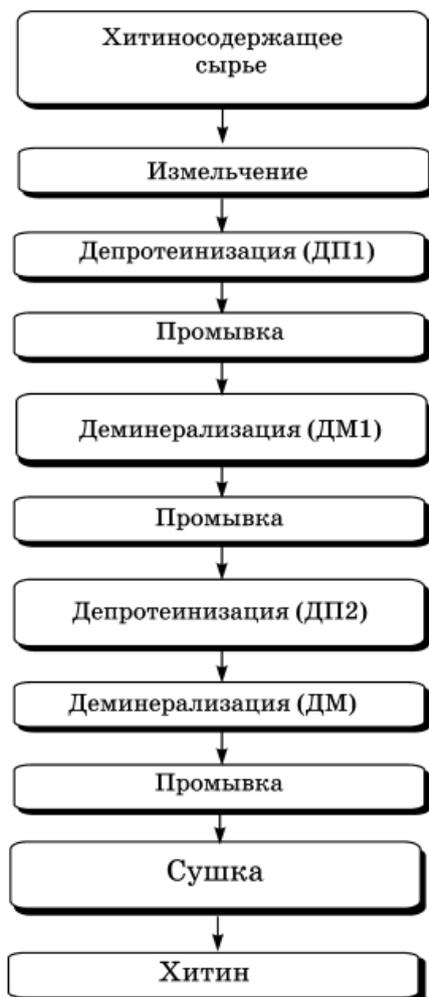


Рисунок П.6 – Схема получения хитина химическим способом

Биотехнологический способ предусматривает использование ферментов для депротенирования сырья, продуктов молочнокислого или уксуснокислого брожения для деминерализации и химических реагентов для депигментации. Для достижения высокой степени депротенирования наиболее эффективными являются способы, предусматривающие применение ферментов и ферментных препаратов микробиологического и животного происхождения таких, как панкреатин, кислые протеиназы Г10Х, щелочные протеиназы Г20Х.

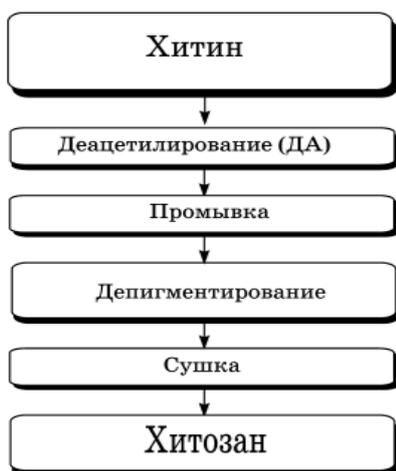


Рисунок П.7 – Схема получения хитозана

Этот способ реализуется в мягких с химической точки зрения условиях, при совмещении в одном процессе нескольких операций депротенирования и деминерализации, что упрощает процесс и приводит к повышению качества готового продукта, максимально сохраняя функциональные свойства готового хитозана. Но ограничивающим этот метод является применение дорогостоящих ферментов или штаммов бактерий, невысокая степень депротенирования хитина даже при применении нескольких последовательных обработок в свежееинокулированных ферментерах, а также необходимость обеспечения стерильности производства. Поэтому в настоящее время метод развит недостаточно и пока не нашел широкого применения в промышленности.

Электрохимический метод получения хитозана позволяет в одном технологическом процессе получать хитин достаточно высокой степени очистки и ценные в пищевом отношении белки и липиды. Сущность технологии получения хитина электрохимическим способом заключается в проведении стадий депротенирования, деминерализации и обесцвечивания хитинсодержащего сырья в водно-солевой суспензии в электролизерах под действием электромагнитного поля, направленного потока ионов, образующихся в результате электролиза воды  $H^+$  и  $OH^-$  ионов и ряда низкомолекулярных продуктов, обуславливающих кислую и щелочную реакцию среды, а также ее окислительно-восстановительный потенциал соответственно (рисунок П.8).

Среди преимуществ данного метода является отсутствие необходимости в применении токсичных химических реагентов. Полученный таким образом хитозан обладает высоким уровнем сорбционных свойств и биологической активности, но недостатком данного метода являются высокие энергозатраты [16, 17].



Рисунок П.8 – Получение хитинсодержащих материалов электрохимическим методом

### Теоретический материал к лабораторной работе №5

Пекарские (хлебопекарные) дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – вид одноклеточных микроскопических грибов (дрожжей) из класса сахаромикетов, широко используемый в производстве алкогольной и хлебопекарной продукции, а также в научных исследованиях. В 1996 году пекарские дрожжи стали первыми эукариотами, чей геном был полностью секвенирован. *Saccharomyces cerevisiae* – один из наиболее изученных модельных организмов, на примере которого происходит исследование клеток эукариотов, они легко выращиваются и имеют низкую патогенность для человеческого организма. По сравнению с кишечной палочкой (*Escherichia coli*), клетка дрожжей содержит в несколько раз больше ДНК и имеет более сложную организацию, чем бактерии. Клетки

сохраняют жизнеспособность даже с множественными генетическими маркерами в своем генотипе, что существенно с точки зрения генной инженерии.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются типичным представителем сумчатых грибов класса Ascomycetes. Размножаются почкованием, но имеют и половой процесс развития. Мицелия не образуют. Клетки дрожжей обычно сферической или круглой формы с диаметром от 7 до 10 мкм. Имеют оформленное ядро с диаметром около 2 мкм (рисунок П.9). Ядро окружено двухслойной ядерной оболочкой, соединенной с одной стороны с сетью эндоплазматического ретикула, а с другой – с белками ядерного матрикса. Ядерная оболочка защищает и предохраняет ДНК от внешних неблагоприятных воздействий.

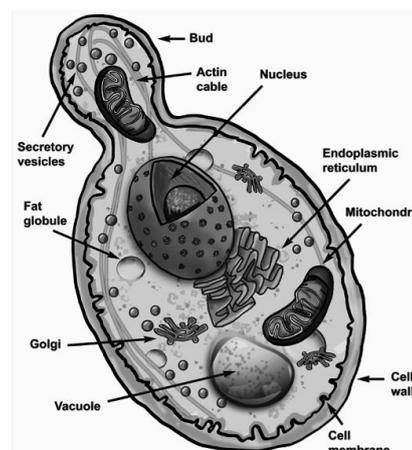


Рисунок П.9 – Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Связь между ДНК и цитоплазмой клетки осуществляется через ядерные мембранные белки – порины, через которые способны проникать молекулы РНК, регуляторные белки и гормоны стероидной природы. Число молекул ДНК (хромосом), приходящееся на одну клетку, является важным таксономическим признаком организма. В интервале между двумя последующими делениями клетки не имеют четко выраженных хромосом. В этот период ДНК расплетена. Ядро заполняет гетерохроматин комплекс ДНК, РНК и ядерных белков.

Характерной особенностью дрожжей является отсутствие минорных оснований (6-метиладенина, 1-метилгуанина, 5-метилцитозина, 5-оксиметилцитозина), встречающихся в следовых количествах у высших эукариот в тРНК и рРНК.

При исследовании РНК было показано, что отношение суммарного количества пуриновых и пиримидиновых оснований также обнаруживает значительное постоянство. Эта величина дополнительно характеризует нуклеотидный состав микроорганизмов. Для дрожжей она в среднем колеблется в интервале 1,00 – 1,07. Первичная, вторичная и третичная структуры РНК и ДНК одинаковы для всех эукариотических организмов.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным модельным организмом для изучения их генетического материала, в частности выделения нуклеопротеидов.

Нуклеопротеиды – это комплексные соединения нуклеиновых кислот и белков. По характеру нуклеиновой кислоты (НК), входящей в состав нуклеопротеида, различают дезоксирибонуклеопротеиды (ДНП) и рибонуклеопротеиды (РНП). ДНП содержатся в ядрах всех клеток (вещество хромосом), митохондриях и головках сперматозоидов. Из РНП состоят рибосомы, вирусы, информосомы (рисунки П.10–П.11). В каждой из таких структур содержится одна или несколько молекул РНК и десятки различных белков [18].

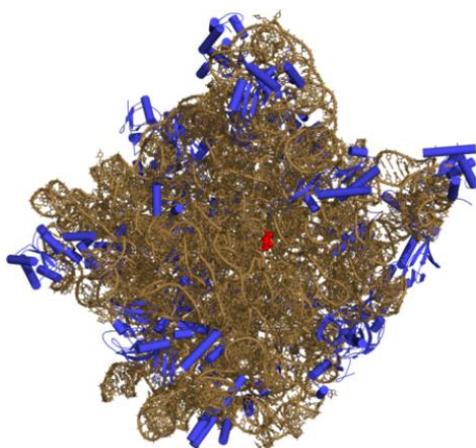


Рисунок П.10 – Нуклеопротеидный комплекс – субчастица 50S рибосом бактерий. Жёлтым показана рРНК, синим – белки

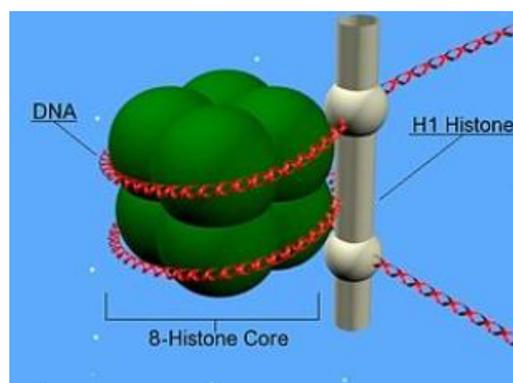


Рисунок П.11 – Комплекс нуклеосомы с гистоном

С физико-химической точки зрения нуклеиновые кислоты (НК) представляют собой линейные полиэлектролиты, состоящие из мономеров-моноклеотидов, которые включают азотистое основание (пуриновое или пиримидиновое), пентозу и остаток фосфорной кислоты. ДНК составляют дезоксирибоза и азотистые основания аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц) и тимин (Т). В состав РНК входят рибоза и те же основания за исключением тимина, который заменен урацилом (У). Перечисленные азотистые основания относятся к главному ряду.

Нуклеиновые кислоты характеризуются определенным составом и распадаются:

– при неполном ферментативном гидролизе РНК и ДНК, щелочном гидролизе РНК (ДНК не гидролизуются под действием щелочей) до структурных единиц нуклеиновых кислот – моноклеотидов;

– при полном гидролизе мононуклеотидов до пуриновых (аденина, гуанина) и пиримидиновых (цитозина, тимина – только в ДНК, урацила – только в РНК) азотистых оснований, пентоз (рибозы – в РНК, дезоксирибозы – в ДНК) и фосфорной кислоты.

Продукты гидролиза нуклеопротеидов могут быть обнаружены в гидролизате специфическими для каждого соединения реакциями [19].

### Теоретический материал к лабораторной работе №6

**Каротиноиды** – это природные органические пигменты, синтезируемые бактериями, грибами, водорослями, высшими растениями и коралловыми полипами, окрашены в жёлтый, оранжевый или красный цвета. По современным представлениям все каротиноиды относятся к группе тетратерпенов и их производных. Тетратерпены состоят из изопреновых фрагментов. Присутствие большого количества (11 и более) двойных сопряженных связей придает каротиноидам высокую биологическую активность. Примером такого соединения может служить  $\beta$ -каротин (рисунок П. 12).

$\beta$ -каротин обладает наибольшей активностью, состоит из двух остатков изопрена и двух симметрично расположенных на концах цепи циклогексановых ( $\beta$ -иононовых) колец с двойной связью в положении 5, 6.

Каротиноиды являются провитаминами А, метаболическими предшественниками витамина А. И витамин А, и  $\beta$ -каротин защищают мембраны клеток мозга от разрушительного действия свободных радикалов, при этом  $\beta$ -каротин нейтрализует самые опасные виды свободных радикалов: радикалы полиненасыщенных кислот и радикалы кислорода [20].

Антиоксидантное действие  $\beta$ -каротина играет важную роль в предотвращении заболеваний сердца и артерий, он обладает защитным действием у больных стенокардией, а также повышает содержание в крови «полезного» холестерина (ЛПВП).

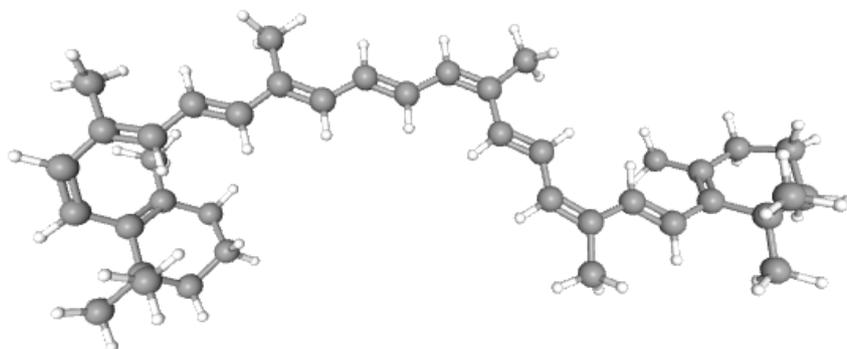


Рисунок П. 12 – Формула  $\beta$ -каротина



Наиболее богаты каротиноидными пигментами морские и наземные беспозвоночные: губки, кишечнополостные, иглокожие, улитки, ракообразные. Наиболее распространенные пигменты у рыб сходны с пигментами ракообразных, моллюсков. Трансформация каротинов и ксантофилов фитопланктона в астаксантин происходит в организме беспозвоночных, особенно ракообразных. Ракообразные, в том числе пресноводный и морской зоопланктон, бентос – рачки, гаммарусы, креветки – главный обильный источник питания для большинства рыб [23].

### **Теоретический материал к лабораторной работе №7**

В основе технологии биосинтеза БАВ главными компонентами являются биообъекты: вирусы, грибы, растительные или животные клетки, биомолекулы, обладающие различными физиологическими свойствами.

Основная задача технологии биосинтеза БАВ – преобразование природного сырья или отходов с помощью биологического объекта (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов, клеточных органелл), поддержание и активизация путей обмена клеток, ведущих к накоплению БАВ в целевом продукте при заметном подавлении других реакций обмена у культивируемого организма, а также получение клеток или их составных частей (преимущественно ферментов) для направленного изменения сложных молекул.

Для нормального роста, размножения биообъекта в процессе биосинтеза БАВ необходимо поддерживать оптимальные условия его культивирования. При нарушении оптимальных условий нарушается обмен веществ, прекращается или ограничивается рост и размножение культуры, снижается выход и качество целевого продукта.

Параметры контроля процесса культивирования микроорганизмов:

- температура;
- рН-среды;
- количество биомассы клеток;
- скорость потребления источников питания;
- количество растворенного кислорода (в случае аэробных биообъектов);
- количество образующегося метаболита [24].

Выделяют две основные технологические стадии микробиологического синтеза БАВ:

- 1) предферментация (подготовительные работы);
- 2) ферментация (накопление и выделение целевого продукта).

Обобщенная схема биотехнологических процессов представлена на рисунке П.15.



Рисунок П.15 – Обобщенная схема биотехнологических процессов

Предферментация включает подготовительные стадии до биосинтеза:

- 1) приготовление и подготовка среды;
- 2) получение и подготовка посевного материала;
- 3) выбор и подготовка оборудования.

Основная стадия в подготовке – стерилизация (коммуникаций, датчиков, пеногасителей, жидких добавок).

Необходимость стерилизации вызвана тем, что микроорганизмы-контаминанты не только могут подавить функциональное развитие биообъекта в силу конкуренции и антибиоза, но и дезорганизовать какую-либо ткань или среду выращивания. Некоторые из них способны продуцировать токсичные вещества, которые могут попасть в целевой продукт. Источники микроорганизмов-контаминантов: почва, вода, окружающий воздух, люди.

В лабораторных условиях стерилизацию питательных сред и других объектов осуществляют в автоклавах паром ( $t = 120-122^{\circ}\text{C}$ ) под давлением не менее 0,3 МПа ( $3 \text{ кгс/см}^2$ ) или холодным способом.

К промышленным штаммам – продуцентам биологически активных веществ предъявляется ряд требований:

- стабильность структурно-морфологических признаков и физиологической активности при длительном хранении и эксплуатации в производстве;

- ❑ повышенные скорости роста и биосинтеза целевых продуктов в лабораторных и производственных условиях;
- ❑ широкий диапазон устойчивости к воздействию неблагоприятных внешних факторов – колебанию температуры, рН среды, аэрации, перемешиванию, вязкости среды;
- ❑ умеренная требовательность к ограниченному числу источников питания.

После завершения ферментации отделяют либо клетки (клеточную массу), либо жидкость, в которой содержится БАВ. В первом случае отходом является культуральная жидкость, во втором – плотная часть (клетки) [25].

Возможные способы выделения целевого продукта представлены на рисунке П.16.



Рисунок П.16 – Возможные способы выделения целевого продукта

Культуральная жидкость, образуемая в процессе ферментации, представляет собой сложную многокомпонентную систему. В водной фазе содержатся клетки продуцента, продукты их жизнедеятельности, непотребленные компоненты питательной среды, мельчайшие капельки жира, пузырьки воздуха, мел. В свою очередь, водная фаза культуральной жидкости (нативный раствор) включает большое число органических и неорганических веществ, коллоидных фракций белков, сухой остаток культуральной жидкости – до 17 % и более.

Содержание биомассы в культуральной жидкости достигает 8-10 %.

Концентрация целевого продукта чаще всего не превышает 1,5 %, что составляет менее 10 % сухого остатка.

В зависимости от целевого назначения конечного продукта (для здравоохранения, технических целей, сельского хозяйства и т.д.) используются схемы производства различной степени сложности, при этом учитывают и место накопления БАВ – внутриклеточного или внеклеточного.

Выбор метода отделения или разделения целевых продуктов зависит от размера частиц (включая микроклетки) образовавшегося продукта:

- крупные – диаметр частиц от 0,1 до 1,0 мм;
- мелкие – диаметр частиц от 0,01 до 0,1 мм;
- инфрамелкие – от 0,0001 до 0,01 мм;
- высокомолекулярные – от  $10^{-5}$  до  $10^{-3}$  мм;
- низкомолекулярные – от  $10^{-7}$  до  $10^{-5}$  мм.

Крупные частицы от мелких отделяют седиментацией при использовании тканевых волокнистых фильтров, сит, сетчатых фильтров, фракционирования в пене и пузырьках.

Низкомолекулярные нерастворимые частицы отделяют диализом, электродиализом, ионным обменом, экстракцией, обратным осмосом [26, 27].

### **Получение витаминов микробным синтезом**

На сегодняшний день разработан метод получения комплекса биологически активных веществ, основанный на комплексной переработке биомассы микроскопического гриба *Blakeslea trispora*, который позволяет выделить за один технологический цикл:  $\beta$ -каротин, убихиноны, эргостерин, фосфолипиды и полиненасыщенные жирные кислоты (рисунки П.17, П.18).



Рисунок П.17 – Микроскопический гриб *Blakeslea trispora*



Рисунок П.18 – Принципиальная технологическая схема получения биологически активных веществ из биомассы *Blakeslea trispora*

Экстракцию биолипидного комплекса осуществляют при температуре 55 °С в присутствии ацетона и этанола в течение 30 мин и 65 мин, соответственно.

Выделение β-каротина осуществляют в присутствии ацетона при температуре 55 °С в течение 18 ч.

Выделение фосфолипидов. Осуществляют при массовом соотношении фосфолипиды:ацетон = 1:5 при температуре  $t=10$  °С в течение 20 мин.

Омыление нейтральных липидов проходит в течение 50 мин при температуре 67 °С. Среда представляет собой смесь нейтральных липидов, ацетона, воды и KOH.

Экстракцию неомыляемой фракции осуществляют в присутствии гексана.

Получение эргостерина осуществляют при объемном соотношении неомыляемая фракция:гексан = 1:5 при температуре 20 °С.

Кристаллизацию убихинонов осуществляют при температуре 20 °С.

Из 100 кг сухой биомассы гриба можно выделить следующие биологически активные вещества:  $\beta$ -каротин – 2,5 кг; фосфолипиды – 8,2 кг; жирные кислоты – 36,2 кг; убихиноны – 0,5 кг.

Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин) в промышленности может быть получен двумя способами: химическим синтезом из 3,4-диметиланилина и рибозы; микробиологическим синтезом с использованием гриба *Eremothecium ashbyi* (рисунок П.19) или генетически измененных бактерий *Bacillus subtilis* (рисунок П.20).



Рисунок П.19 – Технологическая схема получения витамина В<sub>2</sub> с использованием *Eremothecium ashbyi*

Ферментацию проводят при температуре 28–30 °С, с постоянной аэрацией. Расход воздуха составляет 0,3 м<sup>3</sup>/мин. Исходный рН среды составляет 7,0; в ходе ферментации снижается до 4,5–6,0.

После утилизации углеродного субстрата происходит накопление кристаллов рибофлавина. Уровень концентрации витамина В<sub>2</sub> в культуральной жидкости составляет 2,0–2,5 г/дм<sup>3</sup>.

Конечным продуктом технологической схемы является порошок с содержанием витамина В<sub>2</sub> 10 мг/г.



Рисунок П.20 – Технологическая схема получения витамина В<sub>2</sub> с использованием *Bacillus subtilis*

Штамм выращивают в среде на основе глюкозной патоки при температуре 28–30 °С в течение 80–84 ч, в присутствии добавок Ca(OH)<sub>2</sub> – 0,5 % и NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 2,5 % [28].

Получение цианокобаламина (витамина В<sub>12</sub>) в промышленности возможно двумя способами:

1) Химический синтез. Разработан в 1972 году в результате многолетней совместной работы двух исследовательских групп (одна из которых, руководимая Робертом Вудвордом, работала в Гарварде, а другая, возглавляемая Альбертом Эшенмозером, в Швейцарском федеральном технологическом институте в Цюрихе). В общей сложности в работах по синтезу, на протяжении ряда лет, участвовали порядка 100 учёных из примерно 20 стран, а сама разработанная схема синтеза включала 95 стадий.

2) Микробиологический синтез (рисунок П.21):

1) для медицинских препаратов – *Propionibacterium shermanii* (штамм М-82 с выходом продукта до 58 мг/л), *Propionibacterium freudenreichii*, *Pseudomonas denitrificans* (штамм МВ 2436 с выходом продукта до 59 мг/л). Используется глубинное культивирование;

2) для кормовых концентратов витамина В<sub>12</sub> – *Methanococcus halophilus* (с выходом продукта 16-42 мг/л, в питательные среды также добавляются пивные или кормовые дрожжи в качестве источника некоторых питательных веществ и создания благоприятной культуральной среды для метанообразующих бактерий, а также для обогащения кормов витаминами В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР).



Рисунок П.21 – Технологическая схема получения витамина В<sub>12</sub>

Технология получения витамина В<sub>12</sub> включает две стадии:

1) перемешивание в реакторе в течение 80–88 ч в анаэробных условиях до полной утилизации сахара, после чего полученную массу центрифугируют;

2) процесс обработки суспензии во втором аппарате, уже при доступе воздуха; расход воздуха составляет 2 м<sup>3</sup>/ч. Для питательной среды используют глюкозу, до 10 % солей железа, марганца, магния и кобальта (концентрация соли колеблется от 10 до 100 мг/л), сульфат аммония.

Выход кристаллического витамина В<sub>12</sub> составляет 40 мг/л.

Разработана также технология получения цианокобаламина с использованием *Bacillus circulans* в течение 18 ч при температуре 65–75°C в нейтральных условиях. Выход витамина составляет 2–6 мг/л [29].

Для получения витамина С в промышленности могут быть использованы пять методов:

1. Бензоиновый метод. В основе лежит конденсация – трезозы и этилглиоки кислота в присутствии KCN. Недостатками данного метода является низкий выход конечного продукта и дефицитное исходное сырье.

2. Циангидриновый метод. Аскорбиновую кислоту получают на основе L-ликсозы или L-ксилозы. Данный метод не используется на практике из-за сложного процесса получения исходного сырья.

3. Получение аскорбиновой кислоты из свекловичного жома, полученного из отходов производства сахара. Данный метод был разработан в Америке в 1904 году, однако не нашел широкого практического применения из-за низкой рентабельности (из 100 кг жома получают всего 2,5 кг витамина С).

4. Химико-микробиологический метод получения аскорбиновой кислоты из D-глюкозы состоит из 5 стадий: 2-х микробиологических и 3-х химических. В основе метода лежит окисление D-глюкозы уксуснокислыми бактериями до кальциевой соли 5-кето-D-глюконовой кислоты, которую превращают в L-аскорбиновую кислоту.

Преимущества метода: минимальное использование химических реагентов. Однако производительность продукта низкая, и процессы микробиологического синтеза трудно контролировать.

5. Метод Рейхштейна-Грюсснера (1933 г.) заключается в синтезе L-аскорбиновой кислоты из 2-кето-L-гексоновой кислоты. Основное и вспомогательное сырье данного метода разрешено применять в пищевой промышленности. Метод Рейхштейна-Грюсснера широко распространен по всему миру.

Метод Рейхштейна-Грюсснера включает 5 стадий (рисунок П.22):

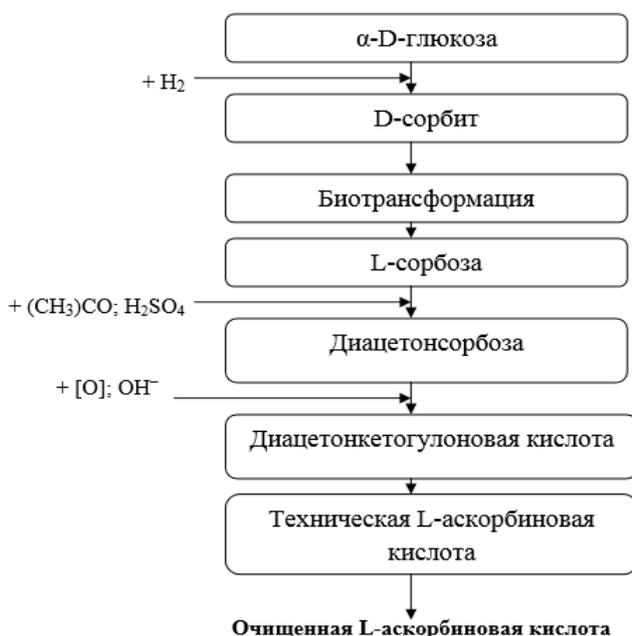


Рисунок П.22 – Схема получения аскорбиновой кислоты методом Рейхштейна

1) получение D-сорбита из D-глюкозы методом каталитического восстановления глюкозы водородом при давлении 8–10 МПа и температуре 135–140 °С;

2) получение α-сорбозы из D-сорбита путем биохимического глубинного окисления уксуснокислыми бактериями (*Acetobacter suboxydans*);

3) получение диацетонсорбозы путем обработки сорбозы ацетоном (ацетонирование) в присутствии серной кислоты;

4) окисление диацетонсорбозы в диацетонкетогулоновую кислоту;

5) получение L-аскорбиновой кислоты из гидрата диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты (деацетонирование → этерификация → «енолизация» → «лактонизация»);

6) Перекристаллизация технической аскорбиновой кислоты в чистый продукт. Выход продукта в пересчете на глюкозу составляет в целом до 54 %.

В промышленных масштабах витамин С получают двумя методами: методом Рейхштейна и двухстадийным ферментативным синтезом (рисунок П.23).

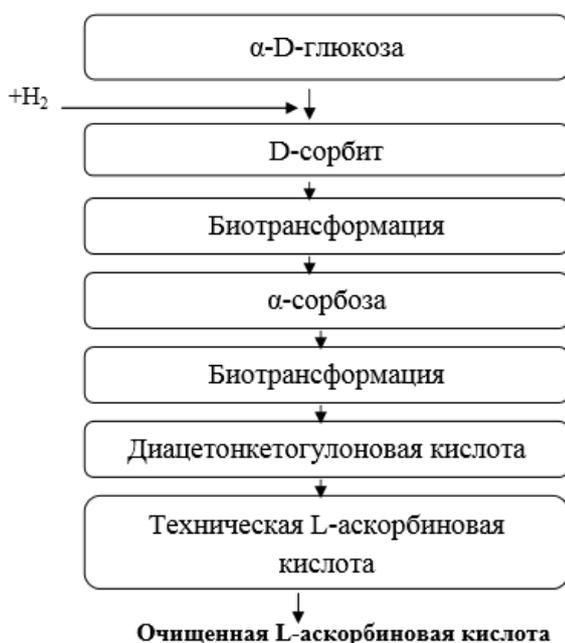


Рисунок П.23 – Схема получения L-аскорбиновой кислоты ферментативным синтезом

По методу Соноямы происходит окисление D-глюкозы клетками *Erwinia sp.* до 2,5-диокси-D-глюкозы с последующим восстановлением до 2-оксо-L-гулоновой кислоты с помощью *Corynebacterium sp.*; эффективность переработки сырья на первой стадии составляет 94% через 24 ч, а на второй – 92% через 66 ч (рисунок П.24).

Затем образовавшаяся 2-оксо-L-гулоновая кислота легко превращается в кислых условиях в L-аскорбиновую. Гены ферментов, которые осуществляют две указанные реакции, в настоящее время клонированы, и специалистами фирмы Genentech получен рекомбинантный штамм *Erwinia herbicola*, который осуществляет весь процесс превращения D-глюкозы в 2-оксо-L-гулоновую кислоту с последующим окислением в L-аскорбиновую кислоту. Однако рост клеток полученного рекомбинантного штамма *Erwinia herbicola* значительно за-

медляется в присутствии D-глюкозы, поэтому пока этот метод получения витамина С экономически невыгоден [30].

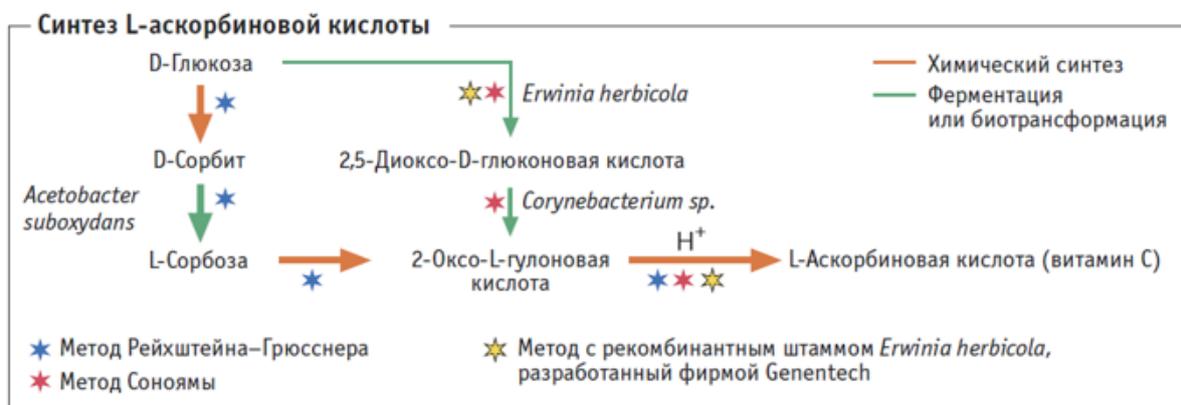


Рисунок П.24 – Методы синтеза витамина С  
<https://propionix.ru/sintez-vitaminov>

### Получение аминокислот микробным синтезом

Биотехнологический метод получения аминокислот может быть реализован в двух вариантах:

#### Энзиматический синтез:

По данному способу процесс получения аминокислот заключается в синтезе предшественника аминокислоты и последующей его трансформации в целевую аминокислоту с использованием выделенных ферментов или микроорганизмов.

#### Ферментативный синтез:

Данный способ получения аминокислот основан на способности микроорганизмов синтезировать все L-аминокислоты, а в определенных условиях – обеспечивать их «сверхсинтез». Основное отличие микробиологической ферментации от энзиматической заключается в использовании не отдельных выделенных, а всех ферментов микроорганизмов.

Продуцентами аминокислот в биосинтезе наиболее часто служат бактерии, относящиеся к родам *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Escherishia*. Субстратом при производстве аминокислот является углеводное сырье (меласса, гидролизаты крахмала и целлюлозы), этанол, уксусная или другие органические кислоты, а также углеводороды. В качестве источника азота используют соли аммония, нитраты, а также аминокислоты [28].

Общая схема получения аминокислот биотехнологическим методом приведена на рисунке П.25.



Рисунок П.25 – Общая схема получения аминокислот биотехнологическим методом

*Промышленное получение D,L-метионина, L-лизина и L-треонина:*

Химический синтез D,L-метионина, L-лизина и L-треонина включает пять стадий. В качестве исходных веществ используют акролеин, метантиол и синильную кислоту. Одним из промежуточных продуктов синтеза является гидантоин – консервант, использующийся при производстве шампуней и моющих средств. В процессе химического синтеза образуется рацемат, в разделении которого нет необходимости, поскольку в организме высших животных D-метионин превращается в L-метионин.

*L-треонин:*

Мутантные штаммы *Escherichia coli* с измененным путем регуляции биосинтеза являются основными промышленными продуцентами L-треонина. Максимальный выход продукта составляет 80 г/л через 30 ч роста. Уже клонированы гены оперона, отвечающего за биосинтез треонина, и в настоящее время ведутся работы, направленные на получение штаммов с еще более высоким выходом продукта. После отделения клеток проводят ультрафильтрацию культуральной жидкости, а затем L-треонин очищают кристаллизацией.

*L-лизин:*

В промышленном производстве L-лизина используются штаммы *Corynebacterium glutamicum*. L-Лизин образуется из диаминопимелиновой кислоты, которая в свою очередь получается из оксалоацетата в результате многоступенчатой реакции конденсации аспарагиновой кислоты и пирувата. В диких штаммах в качестве побочных продуктов этой многостадийной реакции образуются предшественники L-треонина и L-метионина, что снижает выход L-лизина. В штаммах-суперпродуцентах этот побочный путь блокирован благодаря мутациям в генах соответствующих ферментов (используют также ауксотрофные мутантные штаммы, для метаболизма которых необходимо присутствие специфических веществ, например гомосерина).

В настоящее время клонированы гены почти всех ферментов, участвующих в биосинтезе L-лизина и его регуляции, поэтому методы генетической инженерии играют решающую роль в получении штаммов, характеризующихся высоким уровнем синтеза L-лизина. В современном производстве используются штаммы, в которых выход продукта достигает 120 г/л через 60 ч роста. Как правило, применяют воздушно-проточную ферментацию в реакторах объемом до 500 м<sup>3</sup>. В среду роста *C. glutamicum* в качестве источника углерода добавляют растворы сахаров. Уровень биотина в среде поддерживают на постоянном уровне – около 30 мкг/л. После окончания синтеза и удаления клеток L-лизин выделяют на ионообменной колонке или путем распылительной сушки.

#### *Промышленное получение L-аспарагиновой кислоты:*

Одним из методов получения L-аспарагиновой кислоты является экстракция из белкового гидролизата, однако экономически более выгодным оказался синтез клетками *Escherichia coli* из фумаровой кислоты в присутствии аммиака. Реакцию осуществляет фермент аспартаза, находящаяся в клетках микроорганизма. Для выращивания клеток используют реактор, в котором бактерии иммобилизованы на к-каррагинане или полиакриламиде. Выход продукта в такой системе достигает 140 г/(л·ч).

#### *Промышленное получение L-фенилаланина:*

Используется биореактор, в котором в присутствии аммиака происходит аминирование коричной кислоты под действием фермента L-фенилаланинаммонийлиазы (PAL) из *Rhodotorula glutinis* (пигментные дрожжи). В таком реакторе выход продукта достигает 50 г/л, а эффективность переработки сырья составляет 83%. Для ферментации в биореакторах в современном производстве, как правило, используют штаммы-суперпродуценты *E. coli* или кориннебактерий. Практически все гены, продукты которых участвуют в биосинтезе L-фенилаланина, к настоящему времени клонированы. Это позволяет получать новые штаммы-суперпродуценты, применяя генно-инженерные методы [31, 32].

#### **Получение липидов из биомассы микроводорослей**

Микроводоросли – водные одноклеточные растительные организмы, содержащие хлорофилл и осуществляющие кислородный фотосинтез.

В последнее время значительно возрос интерес к биотехнологии микроводорослей как источнику витаминов и других ценных биологически активных соединений, используемых для обогащения рациона людей и животных. Коммерческое использование микроводорослей для извлечения специфических химических веществ началось с *Dunaliella salina*, культивируемой с 1970-х гг. для получения β-каротина. Широкое распространение получило культивирование *Haematococcus pluvialis* Flotow и *Cryptocodinium cohnii* Seligo для получения астаксантина и длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, соответственно. Из более чем 25 тыс. известных на сегодняшний день микроводорослей в коммерческих целях используется не более 15–17 видов. Они накапливают в больших количествах разнообразные биологически активные вещества и входят в состав многих пищевых добавок. Водоросли и их экстракты используют в косметике и в производстве кормов для животных. Выделены штаммы микроводорослей для коммерческого получения полиненасыщенных жирных кислот: γ-линолевой (*S. platensis*), арахидоновой (*Porphyridium cruentum*), докозагексановой (*C. cohnii*, *Schizochytrium sp.*), эйкозапентаеновой (*N. oculata*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia sp.*) [33].

Широко изученной микроводорослью является *Chlorella vulgaris*. Характерным свойством клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* является способность к изменению химического состава клеток в широком диапазоне в зависимости от условий культивирования (уровень освещенности, состав питательной среды). Как и высшие растения, микроводоросли содержат нейтральные и полярные липиды. Нейтральные липиды состоят в основном из сложных эфиров глицерина. При благоприятных условиях микроводоросли производят в основном полярные липиды (например, фосфолипиды). Полярные липиды являются структурными компонентами всех живых клеток, входят в состав цитоплазматической, митохондриальной и других мембран, играют существенную роль в мембранной проницаемости, ответственны за расположение ферментов дыхательной цепи и перенос электронов. Поэтому фосфолипиды широко применяются в качестве пищевых и биологически активных добавок [34].

Схема комплексной переработки биомассы *Chlorella vulgaris* представлена на рисунке П.26.

Технология комплексного использования биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* заключается в следующем: штамм культивируется в течение восьми дней на стандартной питательной среде до достижения стационарной стадии роста, затем для клеток штамма создаются стрессовые условия путем пересадки на питательную среду с дефицитом азота для стимулирования накопле-

ния внутриклеточных липидов (культивирование в течение пяти дней). Затем клетки биомассы отделяются от суспензии [35].

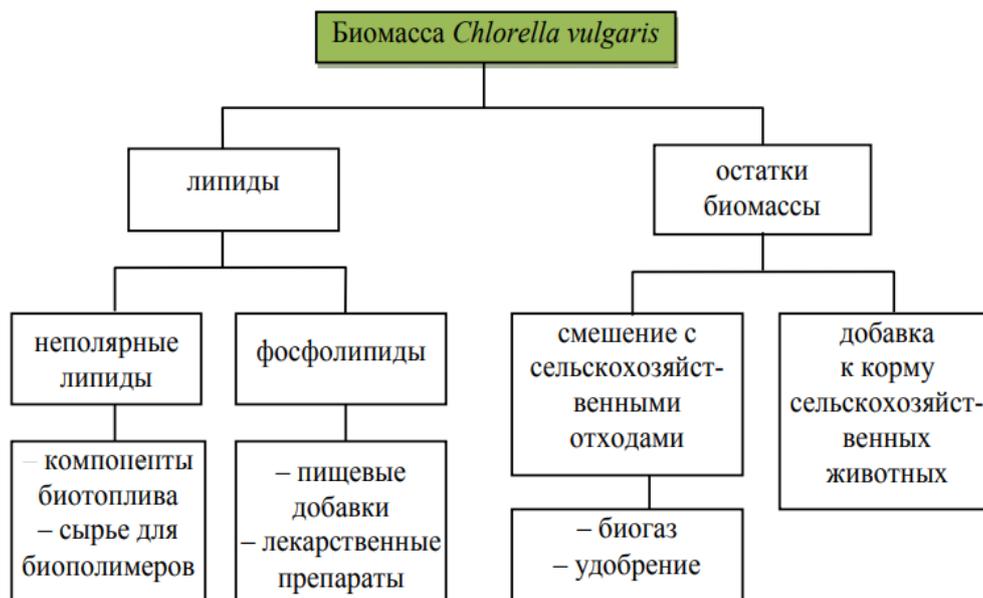


Рисунок П.26 – Схема комплексной переработки биомассы *Chlorella vulgaris*

На следующем этапе стенки клеток разрушаются для более полного извлечения липидов. Извлечение липидов осуществляется смесью полярного и неполярного растворителей, при этом фосфолипиды будут содержаться во фракции полярного растворителя, а триглицериды – неполярного. Эскизная схема получения фосфолипидов представлена на рисунке П.27.

Извлеченные фосфолипиды подвергаются очистке и используются в качестве пищевых и биологически активных добавок для поддержки нервной системы, профилактики неврозов, мигреней, бессонницы, глазных заболеваний, а также восстановления клеток печени. Остатки биомассы (белки, углеводы) подвергаются очистке и используются в качестве добавки для корма сельскохозяйственных животных либо смешиваются с отходами сельского хозяйства и используются для получения биогаза, жидких и твердых удобрений [36].

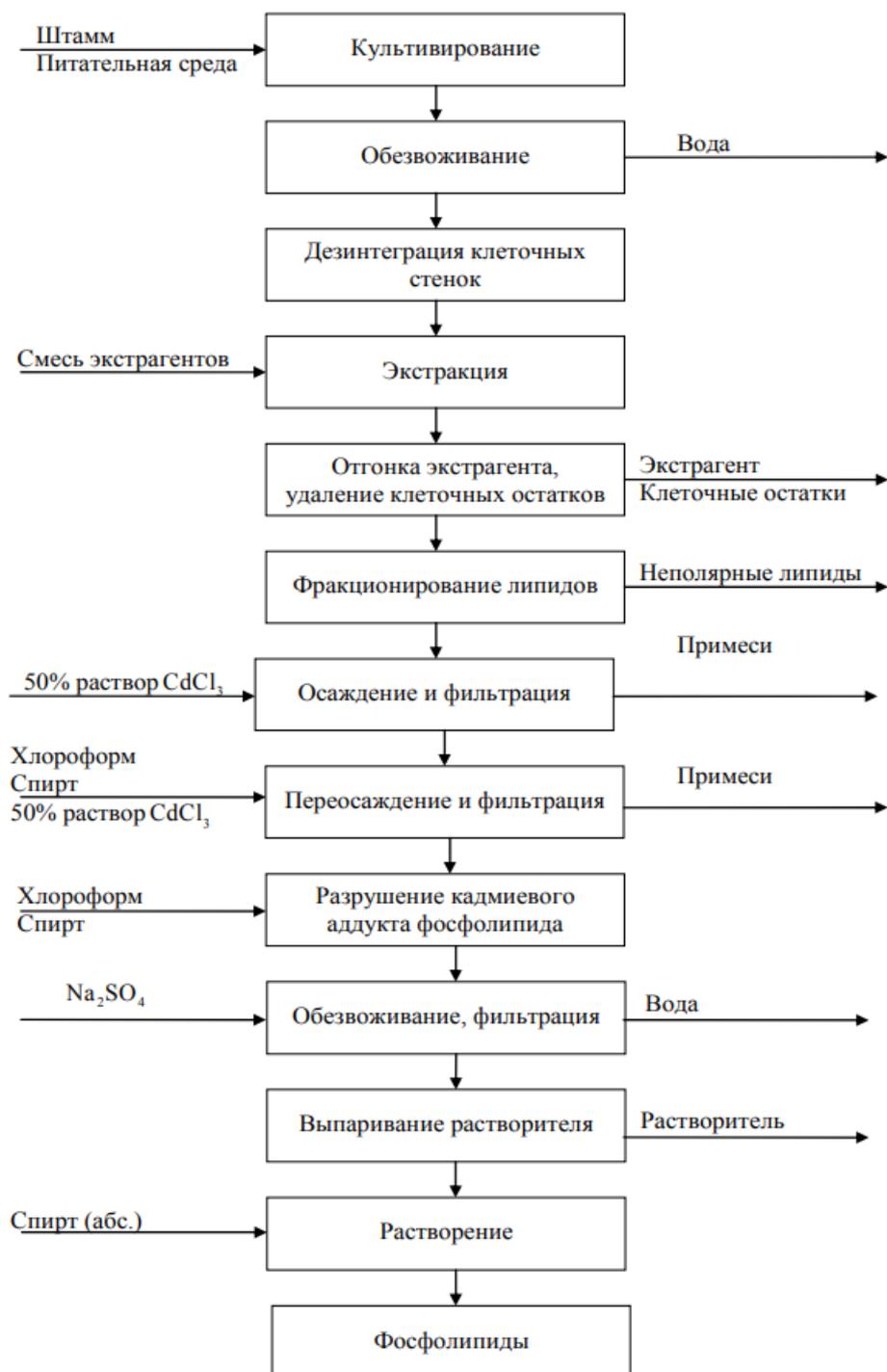


Рисунок П.27 – Эскизная схема получения фосфолипидов из биомассы *Chlorella vulgaris*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедев Л. Р. Методы разделения и очистки биополимеров: учебное пособие / Л. Р. Лебедев, М. Ю. Чепрасова, Н. В. Волкова. – Барнаул: АлтГУ, 2019. – 52 с.
2. Корочанская С. П. Статика белков, витамины, ферменты, гормоны, обмен углеводов: учебно-методическое пособие по биологической химии / С. П. Корочанская, П. Г. Сторожук, И. М. Быков. – Краснодар, 2015. – 81 с.
3. Илларионова Е. А. Биологически активные пищевые добавки. Оценка эффективности и безопасности: учебное пособие / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский. – Иркутск: ИГМУ, 2020. – 56 с.
4. Осинцева Л. А. Мед и воск – основные продукты пчеловодства / Л. А. Осинцева –Новосибирск: Новосиб. гос. аграр. ун-т, 2000. – 32 с.
5. Пименов М. Ю. Мёд. Товароведческая характеристика и ветеринарно-санитарная экспертиза: учебное пособие / М. Ю. Пименов. – М.: Аквариум-Принт, 2015. – 128 с.
6. Заикина В. И. Экспертиза меда и способы обнаружения его фальсификации: учебное пособие / В. И. Заикина. – М.: Издательско-торговая корпорация «Дашков и К°», 2012. – 168 с.
7. Грязькин А. В. Недревесная продукция леса: учебник для вузов / А. В. Грязькин. – М.: Издательство «Лань», 2021. – 248 с.
8. Осинцева Л. А. Технология, показатели качества, безопасности и товароведная оценка продуктов пчеловодства: учебное пособие / Л. А. Осинцева. – Новосибирск: Новосиб. гос. аграр. ун-т., 2012. – 177 с.
9. Соловьева В. Прополис, воск, мумие, пчелиный яд / В. Соловьева. – М.: АСТ Изд-во, 2008. – 159 с.
10. Крылов В. Н. Маточное молочко пчел / В. Н. Крылов, С. С. Сокольский. – Краснодар: Агропромполиграфист, 2000. – 216 с.
11. Колосова С. В. Разработка технологии получения и оценка эффективности продуктов пчеловодства для создания биологически активных добавок / С. В. Колосова, Л. Б. Умиралиева, И. В. Кашкарова, А. Т. Ибраихан, Д. О. Крупский // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2022. – № 1. – С. 18-31.
12. Хисматуллин Р. Г. Стандартизация и качество пыльцы / Р. Г. Хисматуллин, Р. З. Кузьяев, Я. Э. Ляпунов, Г. И. Леготкина, Т. В. Захарова, Н. В. Авдеев // Пчеловодство. – 2004. – №7. – С.48-49.
13. Харитоновна М. Н. Влияние методов стабилизации на качество перги / М. Н. Харитоновна // Пчеловодство. – 2011. – №7. – С. 50-51.
14. Данилевская Н. В. Основы фармакогнозии. Лекарственное сырье животного и растительного происхождения: учебное пособие / Н. В. Данилев-

- ская, А. А. Дельцов. – М.: Издательский дом «Научная библиотека», 2014. – 160 с.
15. Bernal J. L. Physico-chemical parameters for the characterization of pure beeswax and detection of adulterations/ J. L. Bernal, J. J. Jimenez, M. J. del Nozal, L. Toribio, M. T. Martin // *European Journal Of Lipid Science And Technology*. – 2005. – V. 107. – P. 158-166.
  16. Хитин и хитозан: получение, свойства, применение: справочник / под ред. К. Г. Скрябина, Г. А. Вихорева, В. П. Варламова. – М., 2002. – 368 с.
  17. Осовская И. И. Дополнительные главы технологии полимерных материалов. Физико-химические свойства хитина, хитозана и волокон на их основе: учебное пособие / И. И. Осовская. – СПб.: ВШТЭ СПбГУПТД, 2021. – 80 с.
  18. Немцев С. В. Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных / С. В. Немцев. – М.: ВНИРО, 2006. – 134 с.
  19. Жеребцов Н. А. Биохимия: учебник для вузов / Н. А. Жеребцов, Т. Н. Попова, В. Г. Артюхов. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2002. – 696 с.
  20. Абрамова З. И. Исследование белков и нуклеиновых кислот: учебное пособие / З. И. Абрамова. – Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2006. – 157 с.
  21. Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения / В. И. Дейнека, А. А. Шапошников, Л. А. Дейнека и др. // *Научные ведомости*. – 2006. – №8. – С. 19-25.
  22. Рожнов Е. Д. Каротиноиды: курс лекций / Е. Д. Рожнов, Е. В. Аверьянова. – Бийск: Алт. гос. техн. ун-т, БТИ, 2019. – 42 с.
  23. Мезенова О. Я. Биотехнология рационального использования гидробионтов: учебник / О. Я. Мезенова, Т. М. Сафронова, Н. Т. Сергеева, Т. Н. Слуцкая, Л. С. Байдалинова, А. С. Лысова, Г. Е. Степанцова. – СПб: Издательство «Лань», 2013. – 416 с.
  24. Просеков А. Ю. Промышленное получение биологически активных веществ: учебное пособие / А. Ю. Просеков, О. В. Кригер, Л. С. Дышлюк, Л. К. Асякина. – Кемерово: КемГУ, 2020. – 88 с.
  25. Грачева И. М. Биотехнология биологически активных веществ / И. М. Грачева, Л. А. Иванова. – М.: Издательство НПО «Элевар», 2006. – 453 с.
  26. Разговоров П. Б. Технология получения биологически активных веществ / П. Б. Разговоров. – Иваново: ИГХТУ, 2010. – 72 с.
  27. Слюняев В. П. Основы биотехнологии. Основы промышленной биотехнологии: учебное пособие / В. П. Слюняев, Е. А. Плошко. – СанктПетербург: СПбГЛТУ, 2012. – 56 с.
  28. Новиков Д. А. Фармацевтическая биотехнология: электронный учебно-методический комплекс по учебной дисциплине / Д. А. Новиков. – Минск: Белорусский государственный университет, 2016. – 132 с.

29. Блинов В. А. Общая биотехнология / В. А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162 с.
30. Коротченкова Н. В. Химическая технология витаминов: учебное пособие / Н. В. Коротченкова, А. А. Иозеп. – СПб.: Проспект Науки, 2018. – 224 с.
31. Биотехнология получения белков и биологически активных веществ: краткий курс лекций для студентов I курса направления подготовки 19.04.01 «Биотехнология» / Сост.: Л. В. Карпунина. – Саратов: ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова, 2016. – 87 с.
32. Биотехнология: учебник / А. Я. Самуйленко, Ф. И. Василевич, Е. С. Воронин, И. В. Тихонов, С. А. Гринь, В. А. Гаврилов, Т. Н. Грязнева, В. И. Еремец, А. А. Раевский, И. Л. Боро, Ф. Я. Дадасян / Под ред. А. Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.
33. Мокросноп В. М. Микроводоросли как продуценты токоферолов / В. М. Мокросноп, Е.К. Золотарева // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – V. 7. – № 2. – С. 26–33.
34. Дворецкий Д. С. Технология получения липидов из микроводорослей: научно-электронное издание / Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий, М. С. Темнов, Е. В. Пешкова, Е. И. Акулинин. – Тамбов: Издательство ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015. – 45,4 Мб.
35. Швец В. И. Фосфолипиды в биотехнологиях / В. И. Швец // *Вестник МИТХТ*. – 2009. – С. 4-25.
36. Rodolfi L. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor / L. Rodolfi, G. C. Zitelli, N. Bassi [et al.] // *Biotech Bioeng* 102. – 2009. – P. 100-112.

Учебное издание

Любовь Сергеевна Дышлюк

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ И КОМПОЗИЦИИ ИЗ  
СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. ЧАСТЬ 2

Редактор .....

Уч.-изд. л. 5,9. Печ. л. 5,2

Издательство федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Калининградский государственный технический университет».  
236022, Калининград, Советский проспект, 1