

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

**Л. С. Дышлюк**

**ПРОМЫШЛЕННЫЕ И ИННОВАЦИОННЫЕ  
БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ИЗ СЫРЬЯ  
РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Учебно-методическое пособие по лабораторным работам  
для студентов магистратуры  
по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология

Калининград  
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»  
2022

Рецензент

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

Дышлюк, Л. С.

Промышленные и инновационные биотехнологии продуктов из сырья растительного происхождения: учеб.-метод. пособие по лабораторным работам для студ. магистратуры по напр. подгот. 19.04.01 Биотехнология / Л. С. Дышлюк. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2021. – 60 с.

Учебно-методическое пособие является руководством по проведению цикла лабораторных работ по промышленным и инновационным биотехнологиям продуктов из сырья растительного происхождения студентами, обучающимися по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология. Лабораторные работы предназначены для закрепления теоретического материала и приобретения навыков использования основных нормативно-технических документов, регламентирующих производство пищевых продуктов и биологически активных добавок из сырья растительного происхождения.

Табл. 6, рис. 17, список лит. – 29 наименований

Учебно-методическое пособие рассмотрено и рекомендовано к опубликованию в качестве локального электронного методического кафедрой пищевой биотехнологии 23 сентября 2022 г., протокол № 2

Учебно-методическое пособие по лабораторным работам рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала методической комиссией института агрономии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 30 сентября 2022 г., протокол № 10

УДК 581.19

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	4
Методические указания к лабораторным работам.....	5
Правила техники безопасности при работе в лаборатории.....	6
Лабораторная работа №1. Изучение антиоксидантной активности экстрактов лекарственных растений.....	7
Лабораторная работа №2. Изучение антимикробной активности экстрактов лекарственных растений.....	12
Лабораторная работа №3. Получение полисахаридов растительного происхождения и изучение их свойств.....	19
Лабораторная работа №4. Количественное определение белка в муке злаковых и бобовых культур.....	32
Лабораторная работа №5. Биотехнология производства культуры клеток, тканей и органов растений .....	36
Лабораторная работа №6. Получение биоразлагаемых пленок на основе полисахаридов и изучение их свойств.....	49
Список литературы.....	57

## ВВЕДЕНИЕ

Цель настоящего учебно-методического пособия – помочь студентам направления 19.04.01 Биотехнология овладеть основными навыками проведения исследований в области промышленных и инновационных биотехнологий продуктов из сырья растительного происхождения. Это способствует лучшему усвоению программы курсов «Сырье растительного происхождения в пищевой биотехнологии», «Парафармацевтики в пищевой биотехнологии» и «Биоконверсия и биокатализ в пищевой биотехнологии» в соответствии с действующими государственными стандартами образования.

Лабораторный практикум знакомит студентов с организацией биотехнологической лаборатории по производству культур клеток, тканей и органов растений, ее оборудованием и приборами, современными способами культивирования растений *in vitro*, помогает овладеть техникой приготовления питательных сред для выращивания культур клеток, тканей и органов растений, выделения эксплантов растений и введения их в культуру *in vitro*, клонирования и микрочеренкования растительных тканей, выращивания каллусных культур. Особое внимание уделено получению экстрактов лекарственных растений и изучению их антиоксидантных и антимикробных свойств разными методами. Приведены подробные сведения о выделении растительных полисахаридов, а также о методах измерения содержания белка в растительных объектах в связи с перспективами получения альтернативного белка. Одна из лабораторных работ посвящена получению биоразлагаемых пленок на основе природных полисахаридов и изучению их физико-химических свойств.

## Методические указания к лабораторным работам

Каждая лабораторная работа начинается с рассмотрения ее цели и теоретической части изучаемой темы. Затем дается перечень необходимого оборудования, приборов, материалов, приводятся задания и порядок выполнения лабораторной работы, краткое ее содержание, методы исследования и требования к оформлению. Список рекомендуемой литературы приведен в конце методических указаний.

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 в нем:

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

## Правила техники безопасности при работе в лаборатории

1. Перед началом занятий необходимо надеть белые халаты.
2. На рабочем месте не следует держать никаких посторонних предметов. Сумки и пакеты укладывают в специально отведенное для них место.
3. Категорически запрещается пить воду из химической посуды, а также пробовать на вкус химические реактивы.
4. Не включать и не выключать без разрешения преподавателя рубильники и приборы. Следить за состоянием изоляции проводов, электроарматуры и оборудования.
5. Горячие и раскаленные предметы ставить только на асбестовую сетку или иную термостойкую прокладку.
6. При работе с крепкими кислотами и щелочами необходимо:
  - а) при отмеривании и переливании кислоты и щелочи надевать защитные очки, резиновые перчатки и поверх халата прорезиненный фартук;
  - б) не втягивать кислоту пипеткой в рот, использовать для отмеривания кислоты дозаторы или резиновую грушу;
  - в) при закрытии жирометов пробками и при встряхивании завертывать их в салфетки;
  - г) при ввертывании в жиромет резиновой пробки, а также при отсчете показателя содержания жира жиромет держать за расширенную часть, завернутую в салфетку;
  - д) вынимая пробки из жирометов, держать приборы отверстиями в сторону от себя и от окружающих;
  - е) отработанные кислоты и щелочи сливать через воронку в специальные бутылки.
7. При попадании на руки или лицо кислоты пораженные места сразу же промыть чистой водой, залить слабым раствором соды и снова чистой водой. Если кислота попала на одежду, ее нейтрализуют содой, а затем смывают водой.
8. Если жиромет в центрифуге разбился, необходимо немедленно промыть диск содовым раствором, чистой водой и протереть его насухо.
9. При воспламенении горючих жидкостей (бензин, эфир, спирт и др.) следует быстро погасить горелки, выключить электронагревательные приборы и принять меры к тушению пожара.
10. По окончании работы привести в порядок рабочее место (вымыть посуду, поставить на рабочее место реактивы, приборы и т. п.).

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

**Цель работы:** получить водно-этанольные экстракты лекарственных растений и измерить их антиоксидантную активность разными методами.

## 1.1 Теоретические положения

В процессе метаболизма в клетке образуются и накапливаются активные формы кислорода (АФК), разрушающие структуру и вещества клетки. По своей природе они являются радикалами, которые способны частично или полностью разрушают липиды, протеины, вызывают мутацию клеток и генов. В конечном итоге в клетке и во всем организме в целом нарушается обмен веществ, возникает окислительный (оксидативный) стресс [1, 2].

Задачей антиоксидантов является связывание и выведение свободных радикалов из организма (рисунок 1.1). Таким образом, антиоксиданты представляют собой вещества природного или синтетического происхождения, тормозящие оксидативный стресс путем влияния на одну или несколько стадий образования АФК. В организме человека существует собственная система борьбы с избыточным количеством свободных радикалов – антиоксидантная система. Однако её эффективность падает под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды. Несбалансированное питание, стрессы, неблагоприятная экологическая обстановка и многие другие факторы негативно влияют на антиоксидантную систему организма [3, 4].



Рисунок 1.1 – Механизм действия антиоксидантов

Богатым источником антиоксидантов, которые, в основном, представлены полифенолами, являются растения. Среди вторичных метаболитов растений антиоксидантными свойствами характеризуются антоцианы, флавоноиды, кумарины, фенольные кислоты, танины и др. Например, яркими представителями флавоноидов антиоксидантного действия являются рутин, кверцетин, мангиферин, ресвератрол, апигенин, лютеолин [5] (рисунок 1.2).



Рисунок 1.2 – Химические структуры некоторых флавоноидов

Антиоксиданты в составе продуктов питания или БАД к пище предотвращают развитие таких заболеваний, как онкологические, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные.

В литературе описано большое количество растений с высоким содержанием антиоксидантов: родиола розовая, облепиха крушиновидная, рябина обыкновенная, лапчатка прямостоячая, левзея сафлоровидная, зверобой обыкновенный, тысячелистник обыкновенный, иван-чай, тимьян обыкновенный и многие другие. Среди растений Калининградской области интерес в этом отношении представляют вербейник обыкновенный, живокость высокая, багульник болотный, ладьян трёхнадрезный, скупция кожевенная, лунник оживающий, тайник сердцевидный, синеголовник приморский [6–8].

Сегодня большинство вторичных метаболитов растений получают путем прямой экстракции из растительного материала. На данный момент описано несколько разновидностей экстракции: мацерация, докритическая экстракция сжиженными газами, сверхкритическая флюидная экстракция, субкритическая водная экстракция, экстракция по Сокслету, микроволновая экстракция, ультразвуковая экстракция, жидкостная экстракция под давлением и др.

### 1.2 Задание

1. Приготовить водно-этанольные экстракты лекарственных растений: зверобоя обыкновенного, тысячелистника обыкновенного, шалфея лекарственного, брусники обыкновенной, календулы лекарственной, шиповника, крапивы двудомной, мяты перечной, полыни горькой (на выбор).

2. Построить калибровочный график для измерения антиоксидантной активности полученных экстрактов спектрофотометрическим методом (с реактивом ABTS).

3. Измерить антиоксидантную активность полученных экстрактов с использованием построенного калибровочного графика.

4. Измерить антиоксидантную активность полученных экстрактов методом, основанным на титровании перманганата калия.



5. Сопоставить полученные результаты, полученные разными методами, сформулировать выводы.

### 1.3 Порядок выполнения работы

**Материалы и реактивы:** для экстракции используются высушенные в соответствии с требованиями государственной фармакопеи (Государственная Фармакопея РФ / VIII издание. Т. I-III. Москва: 2015) части высших растений зверобоя обыкновенного, тысячелистника обыкновенного, шалфея лекарственного, брусники обыкновенной, календулы лекарственной, шиповника, крапивы двудомной, мяты перечной, полыни горькой.

**Реактивы:** этиловый спирт концентрации 30, 40, 50, 60, 70 %; вода дистиллированная; 7 мМ раствор 2-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS); 2,45 мМ раствор пероксодисульфата калия; цитратный буфер с рН 4,0; 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (тролокс); 0,05 н. раствора перманганата калия.

**Оборудование, лабораторная посуда:** весы аналитические, водяная баня, рН-метр, электрическая плитка, многофункциональный планшетный ридер; эксикатор с хлористым кальцием, термометр, обратный холодильник, керамическая ступка с керамическим пестиком, ножницы, мерные колбы на 250 и 500 см<sup>3</sup>, конические термостойкие колбы на 250 см<sup>3</sup>, термостойкие колбы со шлифом на 100 см<sup>3</sup>, цилиндр на 100 см<sup>3</sup>, бюксы на 25 см<sup>3</sup>, стеклянные палочки, бюретка, пинцет, универсальная индикаторная бумага, бумажные фильтры.

#### **Ход работы:**

##### *1.3.1 Приготовление растительных экстрактов*

Приготовить растворы этилового спирта концентрации 30, 40, 50, 60, 70 %.

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного растительного сырья (размер фракции не более 1 мм) поместить в колбу со шлифом вместимостью 100 см<sup>3</sup>, добавить 30 см<sup>3</sup> этилового спирта. Колбу присоединить к обратному холодильнику и нагреть на кипящей водяной бане при температуре 30 °С в течение 30, 60 и 90 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение профильтровать через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup> так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавить 30 см<sup>3</sup> этилового спирта той же концентрации. Экстракцию провести еще дважды в описанных выше условиях, профильтровать извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения довести этиловым спиртом до метки и перемешать.

Эксперимент провести для всех концентраций экстрагента.

Водно-спиртовые экстракты разлить в бутылки из затемненного стекла и стерилизовать при 85 °С в течение 15 мин. Хранить образцы экстрактов при комнатной температуре в темном месте.

### 1.3.2 Измерение антиоксидантной активности экстрактов спектрофотометрическим методом

Метод основан на оценке способности потенциальных антиоксидантов улавливать свободные радикалы диаммонийной соли 2-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS)).

Катион-радикал ABTS получают при инкубации смеси, содержащей 7 мМ ABTS и 2,45 мМ пероксодисульфата калия в течение 16–18 ч. Перед определением катион-радикал ABTS разбавить предварительно подготовленным цитратным буферным раствором с  $pH = 4,0$ , приготовленным на этиловом спирте, так, чтобы поглощение при  $\lambda=734$  нм было  $0,70 \pm 0,02$ .

*Построение калибровочного графика.* Для построения калибровочного графика в качестве стандарта используют тролокс (Trolox, 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) в диапазоне концентраций в кювете 1-10 мкмоль/дм<sup>3</sup>. Троlox – это водорастворимый аналог витамина E.

Приготовить реакционную смесь, состоящую из 1 см<sup>3</sup> раствора катион-радикала ABTS и 10 мкл раствора тролокса. В качестве раствора сравнения использовать 0,1 М цитратный буферный раствор, содержащий этанол. Зарегистрировать кинетику убыли оптической плотности раствора в течение трех минут при длине волны 734 нм (A). В качестве холостой пробы использовать реакционную смесь, состоящую из 1 см<sup>3</sup> катион-радикала ABTS и 10 мкл 40 %-ого раствора этилового спирта (A<sub>0</sub>). Для построения калибровочного графика рассчитать  $\Delta A$ , равное разности A<sub>0</sub> и A. Построить зависимость изменения оптической плотности от концентрации тролокса в реакционной среде. Антиоксидантную емкость рассчитать по формуле:

$$AOE = \Delta A \cdot 101 / F, \quad (1.1)$$

где  $F = 0,0297$  – фактор стандарта по калибровочному графику; 101 – разбавление образца в кювете;  $\Delta A$  – разность между оптическими плотностями A<sub>0</sub> и A.

Реакционная смесь состоит из 1 см<sup>3</sup> раствора катион-радикала ABTS и 10 мкл образца. Измерить динамику оптической плотности в течение трех минут при длине волны 734 нм. Расчет вести аналогично, используя калибровочный график (рисунок 1.3).

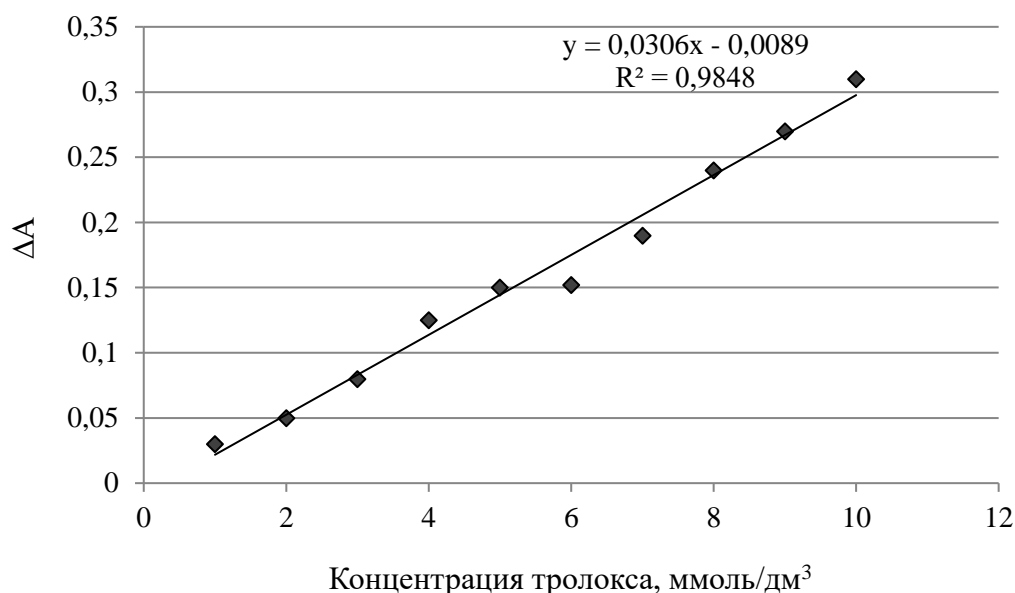


Рисунок 1.3 – Калибровочный график для определения АОЕ экстрактов

### 1.3.3 Измерение антиоксидантной активности экстрактов методом, основанным на титровании перманганата калия

Эквивалентной оценкой биохимической активности экстрактов является определение их общей антиокислительной активности (АОА). Показателем относительной АОА служит объем экстракта в миллилитрах, израсходованный на титрование 1 см<sup>3</sup> 0,05 н. раствора перманганата калия. Чем меньше объем препарата, израсходованный на титрование, тем выше антиокислительная активность препарата.

### Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение активных форм кислорода.
2. Что такое антиоксиданты?
3. Опишите механизм действия антиоксидантов.
4. Какие классы веществ относятся к антиоксидантам? Приведите примеры.
5. Назовите лекарственные растения, богатые антиоксидантами.
6. Назовите известные виды экстракции.
7. Какими методами можно измерить антиоксидантную активность веществ?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

**Цель работы:** получить водно-этанольные экстракты лекарственных растений и измерить их антимикробную активность по отношению к *E. coli*.

### 2.1 Теоретические положения

Все возрастающая множественная резистентность возбудителей инфекций к антимикробным препаратам является одной из главных причин поиска новых антибиотических соединений. Перспективным источником антимикробных средств природного происхождения могут служить высшие растения. Синтетическим препаратам и антибиотикам присущи многие отрицательные свойства: они часто отличаются малым спектром действия, быстро наступающей адаптацией, индивидуальной непереносимостью и т.д.

Вещества разнообразной химической природы, синтезируемые растениями, – богатейший источник лекарственных и профилактических средств, обладающих бактерицидными и фунгицидными свойствами. Особенность экстрактов из лекарственных растений заключается в определенном соотношении биологически активных веществ, способствующих оптимальному воздействию на организм человека, и возможность применять их длительное время [9].

По химической структуре многие природные соединения подобны физиологически активным веществам макроорганизмов (гормонам, витаминам, ферментам и т. д.), что позволяет им, в отличие от синтетических препаратов или антибиотиков, более активно включаться в биохимические процессы. В связи с этим поиск новых антимикробных средств природного происхождения весьма актуален [5, 10].

В литературе приведены экспериментальные данные по использованию растительных экстрактов против патогенных бактерий: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* и дрожжам *Candida*, *Malassezia*, *Trichosporon*.

В качестве антимикробных компонентов часто выступает комплекс вторичных метаболитов, таких как компоненты эфирных масел ( $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен, мирцен, лимонен, сабинен, камфен), фенольные липиды, алкалоиды, гликоалкалоиды, гликозиды, дубильные вещества, стероидные гликозиды (рисунок 2.1).

Для определения антимикробной активности экстрактов используется МУК 4.2.1890-2004 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».



Рисунок 2.1 – Структура компонентов эфирных масел

Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность антибактериального препарата (АБП) – величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК). МПК – минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде.

Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или в бульоне. В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют методы серийных макро- и микроразведений.

Разновидностью метода серийных разведений является также метод, основанный на использовании только двух концентраций АБП, соответствующих пограничным значениям МПК. Этот принцип исследования широко используется в автоматизированных системах для определения чувствительности микроорганизмов.

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК.

В настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и Е-тест.

В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

Е-тест представляет собой узкую полоску полимера (0,5x6,0 см), на которую нанесен градиент концентраций АБП (от минимальных до максимальных).

Подавление роста микроорганизма вокруг полоски Е-теста происходит только в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из носителя, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Значения концентрации АБП в каждом участке носителя типографским способом нанесены на наружной (обращенной к исследователю) поверхности Е-теста. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к носителю. Детальные инструкции по определению чувствительности с использованием Е-тестов прилагаются изготовителем к набору реактивов.

## 2.2 Задание

1. Приготовить водно-этанольные экстракты лекарственных растений: зверобоя обыкновенного, тысячелистника обыкновенного, шалфея лекарственного, брусники обыкновенной, календулы лекарственной, шиповника, крапивы двудомной, мяты перечной, полыни горькой (на выбор).

2. Измерить антимикробную активность полученных экстрактов по отношению к *E. coli* методом серийных разведений в агаре.

3. Измерить антимикробную активность полученных экстрактов по отношению к *E. coli* диско-диффузионным методом.

4. Сопоставить результаты, полученные разными методами, и сформулировать выводы.

## 2.3 Порядок выполнения работы

**Материалы и реактивы:** для экстракции используются высушенные в соответствии с требованиями государственной фармакопеи (Государственная Фармакопея РФ / VIII издание. Т. I-III. Москва: 2015) части высших растений зверобоя обыкновенного, тысячелистника обыкновенного, шалфея лекарственного, брусники обыкновенной, календулы лекарственной, шиповника, крапивы двудомной, мяты перечной, полыни горькой.

Реактивы: этиловый спирт концентрации 30, 40, 50, 60, 70 %; вода дистиллированная; LB-среда жидкая и агаризованная; чистая культура *E. coli*; стерильный физиологический раствор; раствор  $\text{BaCl}_2$  концентрации 0,048 моль/дм<sup>3</sup>; раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$  концентрации 0,18 моль/дм<sup>3</sup>.

**Оборудование, лабораторная посуда:** весы аналитические, водяная баня, рН-метр, электрическая плитка, чашки Петри, бактериологические петли, спектрофотометр, автоклав, водяная баня, пробирки, колбы, бумага фильтровальная.

### Ход работы:

#### 2.3.1 Приготовление растительных экстрактов

Приготовить растворы этилового спирта концентрации 30, 40, 50, 60, 70 %.

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного растительного сырья (размер фракции не более 1 мм) поместить в колбу со шлифом вместимостью 100 см<sup>3</sup>, добавить 30 см<sup>3</sup> этилового спирта. Колбу присоединить к обратному холодильнику и нагреть на кипящей водяной бане при температуре 30 °С

в течение 30, 60 и 90 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение профильтровать через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup> так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавить 30 см<sup>3</sup> этилового спирта той же концентрации. Экстракцию провести еще дважды в описанных выше условиях, профильтровать извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения довести этиловым спиртом до метки и перемешать.

Эксперимент провести для всех концентраций экстрагента.

Водно-спиртовые экстракты разлить в бутылки из затемненного стекла и стерилизовать при 85 °С в течение 15 мин. Хранить образцы экстрактов при комнатной температуре в темном месте.

### *2.3.2 Измерение антимикробной активности экстрактов методом серийных разведений в агаре*

#### *Приготовление суспензии тест-штамма E. coli (инокулюма)*

Концентрация суспензии тест-штамма должна составлять 1,5·10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Практически наиболее приемлемым методом оценки концентрации бактериальной суспензии является измерение ее оптической плотности. Оптическая плотность бактериальной суспензии с концентрацией 1,5·10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> при визуальном контроле соответствует стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Контроль оптической плотности суспензии можно также осуществлять спектрофотометрически (денситометрически). Существуют коммерчески доступные стандарты мутности и спектрофотометры. Бактериальную суспензию можно готовить либо из бульонной, либо из агаровой культуры.

#### *Приготовление инокулюма из агаровой культуры*

Для приготовления инокулюма необходимо использовать чистую суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах. Отобрать несколько однотипных, четко изолированных колоний *E. coli*, выросших на LB-среде. Петлей перенести незначительное количество материала с вершущек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором или питательным бульоном, доводя плотность инокулюма точно до 0,5 по стандарту МакФарланда. Инокулюм следует использовать в течение 15 мин после приготовления.

#### *Приготовление инокулюма из бульонной культуры*

При определении чувствительности быстро растущих бактерий с обычными питательными потребностями для приготовления инокулюма также можно использовать 5-6-часовую бульонную культуру микроорганизма. Для этого отобрать несколько однотипных изолированных колоний, петлей перенести незначительное количество материала в пробирку с 4,0–5,0 см<sup>3</sup> жидкой LB-среды. Инкубировать при 35 °С. Через 5–6 ч инкубации плотность микробной суспензии приблизительно соответствует необходимой, и ее точно довести до 0,5 по МакФарланду путем добавления стерильного бульона или физиологического раствора.

Стандарт МакФарланда может быть либо приобретен, либо приготовлен в лаборатории.

Для приготовления стандарта 0,5 по МакФарланду к 0,5 см<sup>3</sup> раствора BaCl<sub>2</sub> в концентрации 0,048 моль/дм<sup>3</sup> (1,175%-ный раствор BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) медленно при тщательном перемешивании добавить 99,5 см<sup>3</sup> раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в концентрации 0,18 моль/дм<sup>3</sup> (1 %) до получения гомогенной суспензии.

Правильность приготовления суспензии необходимо проверить на спектрофотометре. Поглощение при использовании кюветы 1 см должно составить 0,08–0,10 при длине волны 625 нм.

Полученную суспензию необходимо разлить по 4–6 см<sup>3</sup> в пробирки с герметично закрывающимися крышками. Пробирки должны быть такого же диаметра, как и используемые для приготовления бактериальной суспензии.

Хранить пробирки с суспензией необходимо в темноте при комнатной температуре.

Стандарт мутности необходимо обновлять или проверять его оптическую плотность ежемесячно.

#### *Измерение антимикробной активности экстрактов*

Принцип метода заключается в посеве тестируемых микроорганизмов на чашки Петри с агаром, содержащим изучаемые растительные экстракты. Одновременно проводят контроль роста микроорганизма на чашках без экстрактов.

Сухую агаризованную питательную среду растворить и автоклавировать в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования колбы с питательной средой поместить на водяную баню при 48–50 °С, где выдержать до достижения указанной температуры, после чего в них асептически внести тестируемые экстракты (1 часть экстракта на 9 частей расплавленного агара). Затем среду тщательно перемешать и разлить по чашкам Петри, толщина слоя питательной среды должна быть 3–4 мм.

Параллельно с чашками Петри, содержащими экстракты, для контроля роста приготовить чашки Петри без антибиотиков. Чашки оставить при комнатной температуре для застывания и подсушивания на 10–12 ч.

Конечная посевная доза исследуемого микроорганизма на поверхности питательной среды должна составлять 10<sup>4</sup> КОЕ. Поскольку коммерческие инокуляторы или стандартная бактериологическая петля диаметром 3,0 мм переносят 1–2 мм<sup>3</sup> жидкости, концентрация микроорганизмов в исходной суспензии должна быть 10<sup>7</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Такую концентрацию можно получить при разведении стандартной микробной суспензии, соответствующей стандарту 0,5 по МакФарланду, в 10 раз. Полученную суспензию необходимо инокулировать на поверхность агара в течение 15 мин после приготовления, при этом образуется пятно диаметром 5–8 мм.

После инокуляции чашки оставить при комнатной температуре для подсыхания, далее перевернуть и инкубировать при температуре 35 °С в течение 24 ч.

Учет результатов провести, поместив чашку на темную не отражающую свет поверхность. За МПК принимают концентрацию, вызвавшую полную ингибицию видимого роста. Для дифференцирования нежного роста от налета, оставшегося после инокулята, в ряде случаев целесообразно использовать уве-



личение. Появление единственной колонии на чашке с концентрацией на одно разведение выше, чем явная МПК, можно не учитывать.

### *2.3.3 Измерение антимикробной активности экстрактов диско-диффузионным методом (ДДМ)*

Метод основан на способности антимикробного агента (экстракта) диффундировать из пропитанных им бумажных дисков в питательную среду, угнетающая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

Для определения чувствительности ДДМ использовать такую же, как и для метода разведений в агаре, питательную среду. Плотную питательную среду приготовить в соответствии с инструкцией изготовителя. Важным моментом при определении чувствительности ДДМ является толщина слоя агара в чашке. Она должна составлять  $(4,0 \pm 0,5)$  мм, что достигается при внесении в чашку Петри диаметром 90 мм строго  $20 \text{ см}^3$  агара, диаметром 100 мм –  $25 \text{ см}^3$  агара, а диаметром 150 мм –  $60 \text{ см}^3$  агара. Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри установить на строго горизонтальную поверхность (выверенную по уровню, без впадин и выпуклостей). Соблюдение указанных предосторожностей необходимо в связи с тем, что размер и форма зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставить при комнатной температуре для застывания. Перед инокуляцией необходимо проконтролировать отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

При определении чувствительности ДДМ используют стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Инокулюм следует использовать в течение 15 мин после приготовления. Для инокуляции приготовленных чашек с агаром можно использовать два способа.

1) Наиболее удобным способом инокуляции является использование стерильных ватных тампонов. Тампон необходимо погрузить в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулюма удалить, отжав тампон о стенки пробирки. Инокуляцию проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на  $60^\circ$ .

2) При использовании второго способа стандартный инокулюм наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме  $1\text{--}2 \text{ см}^3$ , равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение  $10\text{--}15$  мин.

Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды нанести диски с растительными экстрактами. Аппликацию дисков провести с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть  $15\text{--}20$  мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более шести дисков с экстрактами. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри поместить в термостат сверху дном и инкубировать при температуре 35 °С в течение 24 ч.

После окончания инкубации чашки поместить сверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста измерить с точностью до 1 мм, предпочтительнее пользоваться штангенциркулем или кронциркулем.

При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста. Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и едва заметный налет у края зоны.

Крупные колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления роста, свидетельствуют о наличии посторонней микрофлоры или о гетерорезистентности популяции микроорганизмов, в этом случае необходимо повторить идентификацию микроорганизма, формирующего эту колонию, и определение чувствительности этого штамма.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Дайте определение антимикробной активности веществ.
2. Опишите явление антибиотикорезистентности микроорганизмов.
3. Какие растительные компоненты характеризуются антимикробной активностью?
4. Что такое стандарт 0,5 по МакФарланду?
5. Опишите сущность методов определения антимикробной активности веществ: метода серийных разведений в агаре; диско-диффузионного метода.
6. Дайте определение минимальной подавляющей концентрации.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

**Цель работы:** выделить пектиновые вещества из кожуры citrusовых, мякоти тыквы, яблочных выжимок, свекловичного жома, корзинок подсолнечника; изучить физико-химические характеристики разных видов пектина.

### 3.1 Теоретические положения

Полисахариды – высокомолекулярные углеводы, полимеры моносахаридов (гликаны). Молекулы полисахаридов представляют собой длинные линейные или разветвлённые цепочки моносахаридных остатков, соединённых гликозидной связью.

В зависимости от полисахаридного состава полисахариды делятся на две группы: гомо- и гетерополисахариды.

Гомополисахариды – полимеры, состоящие из остатков только одного типа моносахарида. Например, из звеньев остатков глюкозы построены целлюлоза, крахмал, гликоген, декстран, из остатков маннозы – маннаны, галактозы – галактаны, фруктозы – фруктаны. Типы гликозидных связей между звеньями остатков моносахаридов могут быть как одинаковыми, так и различными.

Гетерополисахариды – полимеры, в состав которых входят звенья остатков двух и более различных моносахаридов. Например, из звеньев остатков глюкозы и маннозы построен глюкоманнан, галактозы и маннозы – галактоманнан, арабинозы и галактозы – арабиногалактан, рамнозы и галактуроновой кислоты – пектины. Из двух и более типов моносахаридных звеньев построены макромолекулы камедей и слизей [11].

Среди полисахаридов наиболее важными являются два полимера глюкозы растительного происхождения: целлюлоза, в которой остатки глюкозы связаны в положении  $\beta(1\rightarrow4)$ , и крахмал, в котором основной тип связи  $\alpha(1\rightarrow4)$  (рисунок 3.1). Общая эмпирическая формула целлюлозы:  $[C_6H_{10}O_5]_n$  или  $[C_6H_7O_2(OH)_3]_n$ .

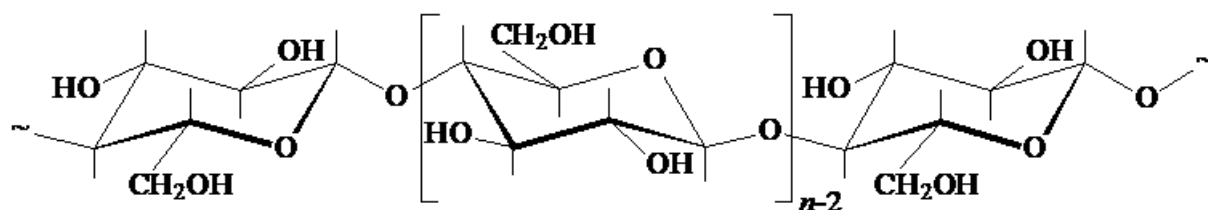


Рисунок 3.1 – Химическое строение целлюлозы

Целлюлоза, линейный гомогликан построенный из остатков глюкозы, связанных в положении  $\beta(1\rightarrow4)$ , является самым распространенным органическим соединением. В клеточных стенках растений целлюлоза составляет 40–50 %, а в таком важнейшем сырье, как хлопковое волокно, – 98 % [12].

Природная целлюлоза обладает высокой механической прочностью, устойчива к химическому и ферментативному гидролизу. Эти свойства связаны с конформацией молекул и особенностями надмолекулярной организации. При полном гидролизе целлюлозы 72%-ной серной кислотой получается D-глюкоза с выходом 96–98 % от теоретического (рисунок 3.2).

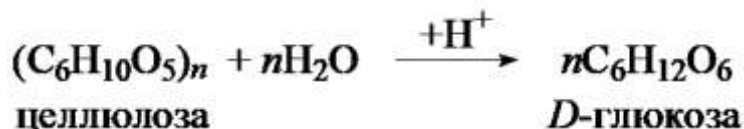


Рисунок 3.2 – Реакция кислотного гидролиза целлюлозы

Классификация нецеллюлозных полисахаридов приведена на рисунке 3.3.



Рисунок 3.3 – Классификация нецеллюлозных полисахаридов

Крахмал, широко распространенный резервный полисахарид растений, является наиболее важным углеводным компонентом пищевого рациона. В растениях крахмал содержится в хлоропластах листьев, плодах, семенах и клубнях. Особенно высоко содержание крахмала в зерновых культурах (до 75 % от сухой массы), клубнях картофеля (примерно 65 %) и других запасующих частях растений.

Крахмал – гомоглюкан, состоящий из нескольких компонентов, различающихся по строению и молекулярной массе:

– линейные амилозы А, В, V – звенья глюкозы соединены гликозидными связями α-(1→4), степень полимеризации 200–1000;

– разветвленный амилопектин – существуют  $\alpha$ -(1→4) и боковые  $\alpha$ -(1→6) с небольшим количеством  $\alpha$ -(1→3) гликозидных связей, степень полимеризации 600–6000.

Соотношение амилоза / амилопектин: 15–25 / 75–85.

Амилоза дает с йодом интенсивно синее окрашивание, амилопектин – красно-фиолетовое.

Крахмал откладывается в форме микроскопических гранул в специальных органеллах, амилопластах. Крахмальные гранулы практически не растворяются в холодной воде, однако они сильно набухают в воде при нагревании. Остальная часть, амилопектин, не растворяется даже при очень длительном кипячении.

Пектиновые вещества (пектины) – комплекс углеводов веществ кислого характера, содержащий в качестве главного компонента пектиновую кислоту, а также арабинан и галактан. Пектиновые вещества входят в состав клеточных стенок и межклеточных образований растений совместно с целлюлозой, гемицеллюлозой и лигнином. Химическое строение пектина приведено на рисунке 3.4.

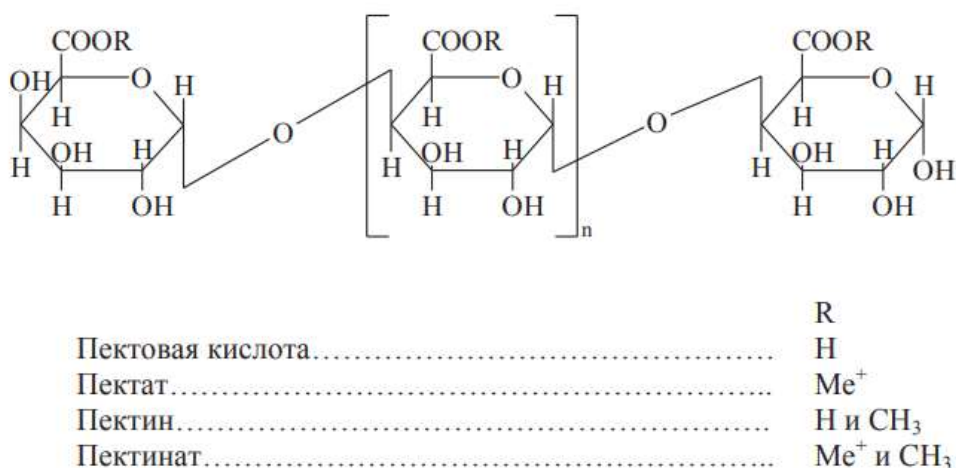


Рисунок 3.4 – Химическое строение пектина

Пектиновые вещества широко распространены в природе (в соках, плодах, корнях, стеблях и листьях многих растений, а также в лигнифицированных тканях древесных растений).

В растениях встречаются пектиновые вещества:

– растворимые в холодной воде пектины содержатся в соках растений (во фруктовых и ягодных соках);

– не растворимые в холодной воде пектины, называемые протопектином, содержатся в тканях корней, корнеплодов (морковь, свекла и т.д.), плодов (яблоки, груши, вишни, цитрусовые и др.), с массовой долей 10–25 % и более по отношению к сухой массе.

Растворимые и нерастворимые пектиновые вещества взаимосвязаны и могут в растительных тканях переходить друг в друга.

Протопектин можно перевести в раствор нагреванием с водой при температуре 100 °С – гидролизом. Такой процесс осуществляют при варке растительной пищи.

Молекулярная масса пектинов колеблется от  $3 \cdot 10^3$  до  $3 \cdot 10^5$ .

Отдельные пектины различаются по степени метилирования карбоксильных групп, по степени разветвленности и т.д.

Растворы пектиновых веществ в воде имеют высокую вязкость и при молекулярной массе пектинов не менее 20000 способны желатинироваться [13].

Для выделения полисахаридов из природного сырья и разделения их смесей используются следующие методы: фракционное осаждение и экстракция; фильтрование, ультрафильтрование, диализ; ферментативная очистка; хроматографические методы (ионообменная хроматография, гель-фильтрация); электрофорез; ультрацентрифугирование.

### **3.2 Задание:**

1. Выделить пектиновые вещества (водорастворимый пектин, кислото-растворимые протопектин и пектовая кислота) из кожуры цитрусовых и осуществить их количественное определение.

2. Выделить пектиновые вещества из мякоти тыквы.

3. Выделить пектиновые вещества из выжимок яблок.

4. Выделить пектиновые вещества из свекловичного жома.

5. Выделить пектиновые вещества из корзинок подсолнечника.

6. Сравнить гелеобразующую способность разных видов пектина.

7. Определить физико-химические характеристики разных видов пектина: массовую долю влаги, пектовой кислоты, балластных веществ, рН 1 %-ного раствора, массовую долю свободных и метоксилированных гидроксильных групп, желирующую способность.

### **3.3 Порядок выполнения работы**

**Материалы и реактивы:** кожура цитрусовых, мякоть тыквы, яблочные выжимки, свекловичный жом, корзинки подсолнечника; дистиллированная вода; водные растворы соляной кислоты концентрации 0,3 М и 0,1 М; уксусной кислоты концентрации 1 М; лимоннокислого аммония концентрации 1 %; едкого натра концентрации 0,4 %; хлористого кальция концентрации 0,5 и 11,11 %; серебра азотнокислого концентрации 2 %; алюминия сернокислого 25 %; раствора аммиака 25 %; ацетон; этиловый спирт (95 %); щавелевая кислота кристаллическая; фенолфталеин, индикатор Хинтона, бромтимоловый синий, крезоловый красный, фенол красный; лимонная кислота кристаллическая.

**Оборудование, лабораторная посуда:** весы аналитические, сушильный шкаф, водяная баня, рН-метр, электрическая плитка, эксикатор с хлористым кальцием, термометр, обратный холодильник, керамическая ступка с керамическим пестиком и мелкоизмельченное стекло, ножницы, терка-рашпиль с мелкими зубцами, мерные колбы на 250 и 500 см<sup>3</sup>, конические термостойкие колбы на 250 см<sup>3</sup>, термостойкие колбы на 1000 см<sup>3</sup>, цилиндр на 100 см<sup>3</sup>, бюксы на

25 см<sup>3</sup>, хлопчатобумажные тканевые фильтры, воронка Бюхнера, колба Бунзена, насос Камовского, стеклянные палочки, бюретка, пинцет, универсальная индикаторная бумага, фарфоровая чаша для выпаривания 1000 см<sup>3</sup>.

### **Ход работы:**

*3.3.1 Выделение и количественное определение пектиновых веществ из кожуры цитрусовых*

Метод основан на переводе пектиновых веществ в растворимое состояние, превращении в пектиновую кислоту с дальнейшим осаждением последней в виде кальциевой соли и учетом ее весовым способом.

В зависимости от цели исследования можно определять отдельно растворимый пектин и протопектин, либо общее количество пектиновых веществ. Ход определения в обоих случаях одинаков, с тем лишь отличием, что в первом случае осаждают и учитывают пектиновую кислоту отдельно в двух экстрактах, а во втором – экстракты объединяют и определяют общее количество пектиновых веществ.

#### *3.3.1.1 Пробоподготовка*

Исходный материал (кожура свежих апельсинов или грейпфрутов) разрезать с помощью ножниц на небольшие кусочки размером 0,5–1 см и тщательно растереть со стеклом в ступке до однородной массы.

#### *3.3.1.2 Определение влажности пектиновых веществ*

Метод определения влажности заключается в том, что навеску подготовленного материала 0,5–1 г высушивают при температуре 105 °С до постоянной массы и по разности между начальной массой и массой сухого остатка находят массовую влаги в исследуемом продукте.

#### *3.3.1.3 Экстрагирование пектиновых веществ*

##### *Извлечение водорастворимого пектина*

Навеску 25 г измельченной кожуры апельсинов количественно перенести в коническую колбу на 250 см<sup>3</sup>, залить 100 см<sup>3</sup> воды (предварительно нагретой до 45 °С) и выдержать при этой температуре 30 минут (на водяной бане), периодически перемешивая содержимое. После этого полученный водный экстракт аккуратно профильтровать через тканевый фильтр. Для фильтрования использовать колбу Бунзена с воронкой Бюхнера, насос Камовского. Полученный экстракт перенести в мерную колбу на 250 см<sup>3</sup>.

Оставшееся в колбе сырье повторно залить 75 см<sup>3</sup> воды (Т=45°С), выдержать 30 минут на водяной бане, профильтровать и слить в мерную колбу с первым экстрактом. Остаток в колбе третий раз залить 50–60 см<sup>3</sup> воды той же температуры, получить третий экстракт по описанной выше методике, профильтровать и слить в ту же мерную колбу. Содержимое колбы с объединенным экстрактом довести дистиллированной водой до мерной черты. Если раствор получился мутный, его необходимо еще раз профильтровать.

##### *Извлечение кислоторастворимых протопектина и пектовой кислоты*

В коническую колбу на 250 см<sup>3</sup> с оставшимся после экстрагирования водорастворимого пектина сырьем добавить 50 см<sup>3</sup> 0,3 М раствора соляной кислоты. Закрыть колбу пробкой с вертикально поставленным (обратным) холо-

дильником и поместить на 30 мин в кипящую водяную баню. Затем фильтрат вместе с сырьем профильтровать через тканевый фильтр и перенести в мерную колбу на 500 см<sup>3</sup>. Остаток на фильтрате несколько раз промыть горячей водой, сливая промывную воду в ту же мерную колбу.

Фильтр вместе с остатком перенести в экстракционную колбу на 250 см<sup>3</sup>, залить 70 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора лимоннокислого аммония, закрыть пробкой с обратным холодильником и выдержать на кипящей водяной бане 30 мин. Отфильтровать содержимое и перенести в мерную колбу на 500 см<sup>3</sup> с первым экстрактом кислоторастворимых пектиновых веществ. Остаток на фильтрате промыть горячей водой, объединяя промывную воду в той же мерной колбе. Фильтрат охладить до комнатной температуры и довести дистиллированной водой до мерной черты.

#### *3.3.1.4 Подготовка фильтров*

Подогнать хлопчатобумажные тканевые фильтры по размеру используемой воронки Бюхнера, поместить в сушильный шкаф и выдержать при температуре 100 °С в течение 2 ч. Затем фильтры перенести в эксикатор с хлористым кальцием и оставить на 30-40 минут. Далее взвесить массу высушенных фильтров на аналитических весах. Вновь повторять всю процедуру до тех пор, пока масса фильтров перестанет изменяться (точность ±0,0003 г). Полученные значения массы фильтров учитывать в расчетах при определении количества экстрагированных пектиновых веществ.

#### *3.3.1.5 Омыление пектиновых веществ*

##### *Омыление и количественное определение водорастворимого пектина*

В коническую колбу на 250 см<sup>3</sup> отобрать 50 или 100 см<sup>3</sup> (в зависимости от разбавления и от ожидаемого количества пектина) первой вытяжки водорастворимого пектина, прибавить равный объем (50 или 100 см<sup>3</sup>) 0,4%-ного раствора едкого натра и оставить при комнатной температуре на одни сутки. На следующий день раствор подкислить тем же объемом (50 или 10 см<sup>3</sup>) 1 М раствора уксусной кислоты и осадить образовавшуюся пектиновую кислоту 50 (или 100) см<sup>3</sup> 11,1%-ного раствора хлористого кальция. Операцию проводить при комнатной температуре.

Полученный осадок пектата кальция отфильтровать через заранее высушенный до постоянного веса тканевый фильтр и промыть 0,5%-ным раствором хлористого кальция. Затем осадок на фильтрате многократно промыть холодной дистиллированной водой для освобождения от хлористого кальция (проверка по реакции на хлор с азотнокислым серебром). В завершение осадок промыть несколько раз горячей водой для удаления солей.

Фильтр с осадком перенести пинцетом в заранее доведенный до постоянной массы бюкс и высушить до постоянного веса при 100–105 °С. Определить массу высушенного пектина как разность между (масса бюкса + масса фильтра с осадком после сушки) и (исходная масса прокаленного бюкса + масса прокаленного фильтра). Полученный вес сухого пектина умножить на 0,9235, осуществляя тем самым количественный перевод на пектиновую кислоту. Рассчитать процентное содержание пектина с учетом произведенного разбавления.



### *Омыление и количественное определение кислоторастворимых протопектина и пектиновой кислоты*

Со второй вытяжкой кислоторастворимых протопектина и пектиновой кислоты провести аналогично описанной выше методике с той лишь разницей, что эту вытяжку необходимо нейтрализовать едким натром до прибавления щелочи, необходимой для омыления (при этом происходит изменение цвета раствора с бледно-желтого на ярко-желтый). Рассчитать процентное содержание протопектина и пектиновой кислоты с учетом произведенного разбавления.

#### *3.3.1.6 Расчет и оформление результатов*

Рассчитать содержание пектата кальция и пектовой кислоты в первой фракции, а также протопектина и пектиновой кислоты с учетом влажности исходного сырья.

#### *3.3.2 Выделение пектина из мякоти тыквы*

##### *3.3.2.1 Пробоподготовка*

Мякоть тыквы (без семян) натереть на терке-рашпеле с мелкими зубцами и тщательно растереть со стеклом в ступке до однородной массы (жома).

##### *3.3.2.2 Определение влажности пектинсодержащего сырья*

Метод определения влажности заключается в том, что навеску подготовленного материала 0,5–1 г высушивают при температуре 105 °С до постоянной массы и по разности между начальной массой и массой сухого остатка находят массовую влагу в исследуемом продукте.

##### *3.3.2.3 Экстрагирование пектиновых веществ*

Перед началом работы подготовить хлопчатобумажные тканевые фильтры.

*Извлечение пектиновых веществ из исходного сырья.* Навеску 25 г (точность взвешивания до 0,02 г) полученного жома количественно перенести в термостойкую колбу на 1000 см<sup>3</sup> и залить раствором соляной кислоты концентрации 0,1 М, соблюдая модуль ванны 1:20 (из расчета на 1 г сырья – ~20 см<sup>3</sup> раствора реагента). Тщательно перемешать смесь стеклянной палочкой и определить рН с использованием универсальной индикаторной бумаги. Значение рН должно соответствовать интервалу 0,8–1,0. Если рН смеси выше 1,0, то подкорректировать его значение введением дополнительной порции раствора HCl. Поместить колбу на водяную баню, предварительно нагретую до T=60–70 °С, и выдержать реакционную систему при этой температуре в течение 1,5–2 ч, периодически помешивая содержимое покачиванием колбы. Отфильтровать экстракт через хлопчатобумажный тканевый фильтр. Для фильтрования использовать колбу Бунзена с воронкой Бюхнера, насос Камовского. Полученный экстракт перенести в чистую колбу на 1000 см<sup>3</sup>.

Отфильтрованный жом количественно перенести с тканевого фильтра в первую колбу на 1000 см<sup>3</sup>, вторично залить 0,1 М раствором HCl (гидромодуль тот же, 1:20) и выдержать на водяной бане при T=60–70 °С в течение 0,5–1 ч. Отфильтровать полученный экстракт через хлопчатобумажный тканевый фильтр и соединить с экстрактом, полученном в предыдущем опыте.

*Концентрирование экстракта пектиновых веществ.* Объединенный экстракт перелить в фарфоровую чашу для выпаривания на 1000 см<sup>3</sup>, поместить

чашу на водяную баню ( $T=30-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и концентрировать экстракт выпариванием жидкой фазы до достижения вязкоподобной консистенции с содержанием сухого вещества  $\sim 1\%$ . Время выпаривания варьируется в среднем от 3 до 5 ч.

Отбор проб для определения содержания сухого вещества в концентрируемом экстракте. В бюкс на  $25\text{ см}^3$  поместить  $5\text{ см}^3$  сконцентрированного экстракта, высушить до постоянной массы, взвесить на аналитических весах и определить содержание сухого вещества. Если полученная концентрация сухого вещества ниже  $0,8-1,0\%$ , продолжить концентрирование объединенного экстракта.

*Выделение и количественное определение пектиновых веществ.* Выделение пектиновых веществ из сконцентрированного экстракта (концентрата) провести осаждением ацетоном (используется для получения технического пектина) и этиловым спиртом (используется для получения пищевого пектина).

Измерить объем полученного концентрата и разделить на две равные части. Одну часть концентрата вылить при перемешивании в двойной объем ацетона, вторую – в двойной объем этилового спирта ( $C\sim 95\%$ ). При осаждении твердая фаза пектиновых веществ образуется в форме хлопьев белого или бежевого цвета. Профильтровать полученную систему через заранее высушенный до постоянного веса хлопчатобумажный тканевый фильтр. Твердую фазу пектиновых веществ высушить в струе воздуха при комнатной температуре.

Тканевый фильтр с твердой фазой пектиновых веществ перенести в заранее доведенные до постоянной массы бюксы, высушить до постоянной массы при  $T=70-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  и определить массу полученного продукта. Рассчитать процентное содержание пектина в исходном сырье, учитывая его влажность. Сравнить количественный выход готового продукта при использовании разных осадителей.

### *3.3.3 Выделение пектина из выжимок яблок*

Перед извлечением пектина сушеные выжимки в количестве  $100\text{ г}$  измельчить, затем обработать холодной водой в соотношении  $1:2$  для извлечения сахаров, кислот, солей. Пектин в холодной воде не растворяется, поэтому воду подогреть до температуры не выше, чем  $10-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В противном случае происходит вымывание растворимого пектина.

Экстракцию пектина производить горячей водой, подкисленной сернистой или соляной кислотой, при этом он переходит в раствор.

Режим гидролиза для сушеных выжимок: соотношение выжимок и воды  $1:4$ ; температура  $80-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; продолжительность гидролиза  $1\text{ ч}$ . Экстракт отделить от отработанных выжимок отжимом на вакуум-фильтре.

Для очистки горячий экстракт при температуре  $50-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  профильтровать на вакуум-фильтре, затем сконцентрировать до объема  $140\text{ см}^3$  и осадить пектин из раствора этиловым спиртом. Соотношение объемного количества спирта и концентрата должно составлять  $1,2:1$ . Во избежание выпадения вместе с пектином минеральных примесей в спирт после введения концентратов добавить соляную кислоту в количестве  $0,3\%$  и смесь перемешать  $10\text{ мин}$ .

Осажденный пектин отделить от раствора путем вакуум-фильтрования. Пектин, оседающий на фильтрующей перегородке, промыть трехкратно 70%-ным этиловым спиртом, подкисленным соляной кислотой. Затем пектин отмыть от ионов хлора 60%-ным этиловым спиртом.

Далее пектин высушить на воздухе. Выход сухого пектина составляет 5 % от высушенной выжимки.

#### *3.3.4 Выделение пектина из свекловичного жома*

Содержание пектиновых веществ в свекловичном жоме колеблется от 20 до 30 % на воздушно-сухую массу. Гидролиз-экстрагирование пектина проводить из сушеного свекловичного жома в количестве 100 г 1,1–1,5%-ным раствором соляной кислоты при гидромодуле процесса 1:15. Экстрагирование проводить в течение 2 ч при температуре гидролизной смеси 75–76 °С. По истечении времени гидролиза-экстрагирования пектиновый экстракт охладить до 35–40 °С и отфильтровать. Экстракт свекловичного пектина представляет собой прозрачную жидкость светло-серого цвета; содержание пектиновых веществ в нем от 0,5 до 0,8 %; плотность экстракта – 1,01–1,02 г/см<sup>3</sup>; рН от 0,6 до 0,7. При осаждении пектина из пектинового экстракта его обработать 96%-ным этиловым спиртом, при соотношении экстракт к спирту – 1:2. Полученный коагулят отфильтровать, промыть на фильтре от спирторастворимых балластных веществ 70%-ным этиловым спиртом, затем обезвожить 96%-ным этанолом. Полученный таким образом пектин высушить при температуре 50–55 °С и измельчить.

#### *3.3.5 Выделение пектина из корзинок подсолнечника*

Содержание пектиновых веществ в подсолнечнике колеблется от 24,0 до 35,7 % на воздушно-сухую массу. Корзинки подсолнечника измельчить до частиц размером от 1 до 2 мм и направить в количестве 100 г на гидролиз. Предварительное промывание подсолнечной сечки водой снижает выход пектина и ухудшает его свойства. Для проведения процесса экстрагирования пектина подсолнечную сечку смешать с десятикратным количеством воды с температурой от 95 до 98 °С. Полученную смесь разбавить таким же объёмом кипящей воды, содержащей от 6 до 10 г кристаллической щавелевой кислоты на литр. Экстрагирование осуществлять при температуре от 80 до 90 °С в течение 0,5 ч, а затем смесь профильтровать под вакуумом.

Для выделения пектина 100 весовых частей пектинового экстракта смешать с 5,0–7,5 объёмными частями 25%-ного раствора сульфата алюминия. После тщательного перемешивания добавить 20%-ный раствор аммиака до достижения рН среды 3,5–3,9. Коагулят отделить, однократно промыть разбавленным спиртом, высушить и измельчить. Первую стадию очистки (мацерацию) продукта провести следующим образом: 100 весовых частей пектината алюминия смешать со 100 объёмными частями 80%-ного этанола до однородной массы, добавить 700 об./ч солянокислого 45%-ного этанола (300 об./ч 90%-ного, 300 об./ч воды и 114 об./ч 36%-ной HCl). Смесь размешать в течение часа, затем в нее добавить 200 об./ч 95%-ного этанола (для уменьшения набухаемости частиц с целью облегчения фильтрации) и оставить еще на 1 ч. Смесь отфильтро-

вать и промыть на фильтре слабокислым 55–60%-ным этанолом (200 об./ч 95%-ного этанола, 137 об./ч воды и 20 об./ч 36%-ной HCl) с целью полного удаления катионов, затем промыть до нейтральной реакции 70%-ным этанолом. Полученный пектин высушить при температуре 55 °С и измельчить.

*3.3.6 Сравнительный анализ гелеобразующей способности пектина, полученного из разных источников*

Приготовить растворы полученных образцов пектина в воде и разбавленной уксусной (или другой) кислоте разных концентраций. Провести визуальный анализ гелеобразующей способности полученных образцов.

При оформлении результатов написать структурные формулы пектина, пектиновой и пектовой кислот.

*3.3.7 Определение физико-химических характеристик разных видов пектина*

*Определение массовой доли влаги*

Взвешенную навеску пектина массой от 0,5 до 0,8 г поместить в бюкс и высушить в сушильном шкафу при температуре 130 °С в течение 40 мин. Массовую долю влаги пектина рассчитать по формуле:

$$w = \frac{g_1 - g_2}{g_1 - g_0} \cdot 100, \quad (3.1)$$

где  $g_1$  – масса бюкса с навеской до сушки, г;  $g_2$  – масса бюкса после сушки, г;  $g_0$  – масса пустого бюкса, г.

*Определение рН 1%-ного раствора пектина*

Порошок пектина (1 г) растворить при перемешивании в 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Полученную смесь нагревать в течение 10–15 мин при температуре от 50 до 60 °С. Раствор декантировать от нерастворимого остатка и измерить рН потенциометром с применением стеклянного или хингидронного электрода.

*Определение массовой доли пектовой кислоты*

Навеску пектина массой от 0,05 до 0,08 г растворить в 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды со льдом и поставить на 2–3 ч для набухания и растворения пектина. Затем раствор пектина нейтрализовать по фенолфталеину, добавляя 1 см<sup>3</sup> 10%-ной соляной кислоты. В полученный раствор по каплям добавить от 80 до 85 см<sup>3</sup> 96%-ного этилового спирта, энергично перемешивая. Через 1–2 ч образовавшийся осадок пектиновых веществ количественно перенести на плотный бумажный фильтр, промыть три раза водно-спиртовым раствором (четыре части 96%-ного спирта и одна часть воды) и один раз 96%-ным спиртом, не давая осадку высохнуть на фильтре.

Осадок количественно смыть с фильтра горячей водой в стакан вместимостью 500 см<sup>3</sup>, а фильтр поместить в отдельный стакан и промыть 2–3 раза горячей водой. Промывные воды собрать в стакан вместимостью 500 см<sup>3</sup>, куда был смыт осадок пектина, причем количество промывной жидкости не должно превышать 200 см<sup>3</sup>. Содержимое стакана нейтрализовать по фенолфталеину

0,1 М раствором гидроокиси натрия до слабо-розового окрашивания. Для гидролиза пектина добавить 20 см<sup>3</sup> 0,5 М раствора гидроокиси натрия и оставить на 15–20 ч. Затем раствор нагреть до температуры 50–60 °С и профильтровать через плотный бумажный фильтр. По окончании фильтрации фильтр промыть несколько раз горячей водой, присоединяя промывные воды к первому фильтрату. Общее количество жидкости должно быть от 275 до 300 см<sup>3</sup>.

К фильтрату добавить 50 см<sup>3</sup> 1 М уксусной кислоты, 50 см<sup>3</sup> хлористого кальция (2 М), перемешать и поставить на 1 ч, после чего смесь прокипятить в течение 5 мин и профильтровать через высушенный до постоянной массы и взвешенный беззольный фильтр. Осадок на фильтре промыть кипящей водой до отрицательной реакции на ион хлора (проверка по реакции С1 – с азотнокислым серебром). Затем осадок промыть 96%-ным этиловым спиртом. Фильтр с осадком высушить в сушильном шкафу до постоянной массы. Масса осадка принимается равной массе пектата кальция. Содержание пектовой кислоты Пк, %, рассчитать по формуле:

$$\text{Пк} = \frac{(G-g_0) \cdot 100 \cdot 0,92}{G_1}, \quad (3.2)$$

где G – масса бюкса с осадком после сушки, г; G<sub>1</sub> – навеска пектина, г; 0,92 – коэффициент пересчета пектата кальция на пектовую кислоту.

#### *Определение массовой доли балластных веществ*

Навеску пектина массой от 3 до 4 г поместить в коническую колбу, залить подкисленным спиртом (100 см<sup>3</sup> 70%-ного этилового спирта и 5 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты) и перемешать 15 мин. Затем смесь перенести количественно на стеклянный фильтр № 2 и промыть подкисленным спиртом до отрицательной реакции на ионы кальция (с оксалатом аммония) и ионы алюминия (с ализарином). Осадок промыть чистым 75%-ным спиртом до отрицательной реакции на ион хлора (с азотнокислым серебром), затем чистым 96%-ным спиртом и высушить в сушильном шкафу при температуре от 80 до 85 °С до постоянной массы. Количество балластных веществ Б в %, рассчитать по формуле:

$$\text{Б} = \frac{(G_1 - G_n) \cdot 100}{G_1}, \quad (3.3)$$

где G<sub>n</sub> – масса пектина после промывки спиртом, г.

#### *Определение массовой доли свободных и метоксилированных гидроксильных групп*

Промытый и высушенный пектин (1 г) поместить в колбу объемом 300 см<sup>3</sup>, смочить чистым 96%-ным этиловым спиртом для предотвращения комкования и добавить 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, перемешать и оставить на ночь до полного растворения пектина. Раствор титровать 0,1 М NaOH при добавлении шести капель индикатора Хинтона до появления красного окраши-

вания, не исчезающего в течение 1 мин. Для индикатора смешать один объем 0,4%-ного бромтимолового синего, один объем 0,4%-ного крезоло красного, три объема 0,4%-ного фенола красного и один объем дистиллированной воды. Содержание свободных карбоксильных групп,  $K_c$ , %, рассчитать по формуле:

$$K_c = \frac{a}{G_1} \cdot 0,45, \quad (3.4)$$

где  $a$  – количество 0,1 М раствора NaOH, израсходованное на титрование, см<sup>3</sup>; 1 см<sup>3</sup> 0,1 М раствора NaOH соответствует 0,0045 г COOH.

В этом же растворе определяют количество метоксилированных карбоксильных групп. К нейтрализованной пробе после определения содержания свободных карбоксильных групп добавить из бюретки 10 см<sup>3</sup> 0,5 М NaOH. Колбу закрыть и оставить на 2 ч при комнатной температуре для гидролиза метоксилированных карбоксильных групп. Затем к раствору добавить из бюретки 10 см<sup>3</sup> 0,5 М HCl и избыток последней титровать 0,1 М NaOH. Количество 0,1 М NaOH, израсходованное на второе титрование, соответствует количеству этерифицированных групп ( $K_э$ , %) в исследуемой пробе, которое рассчитать по формуле:

$$K_э = \frac{b}{G_{пв}} \cdot 0,45, \quad (3.5)$$

где  $b$  – количество 0,1 М NaOH, израсходованное на второе титрование, см<sup>3</sup>;  $G_{пв}$  – навеска промытого и высушенного порошка пектина, г.

Для расчета количества метоксилированных карбоксильных групп необходимо вводить поправку на ацетильные группы, которые также гидролизуются при этих условиях. Количество метоксильных групп ( $K_m$ , %), с учетом поправки на ацетильные группы составляет:

$$K_m = K_э - A_{ц}, \quad (3.6)$$

где  $A_{ц}$  – количество ацетильных групп, %.

#### *Определение желирующей способности пектина*

Полученный пектин залить 50 см<sup>3</sup> воды в фарфоровой чашке, дать постоять некоторое время для набухания, затем добавить 25 г сахарного песка и энергично кипятить на песчаной бане 15 мин. В упаренную смесь прилить 1 см<sup>3</sup> 40%-ного раствора лимонной кислоты, хорошо перемешать и разлить в плоские пластмассовые или фарфоровые формочки. Через 2,5 ч желе застывает и может быть использовано для анализа.

## Вопросы для самоконтроля

1. Что такое полисахариды? Назовите основные функции полисахаридов.
2. Назовите самый распространенный в природе полисахарид.
3. Дайте определения гомополисахаридов и гетерополисахаридов. Приведите примеры.
4. Напишите реакцию кислотного гидролиза целлюлозы.
5. Из каких компонентов состоит крахмал? Каково их соотношение?
6. Напишите структурную формулу пектина.
7. Каковы различия у цитрусового и тыквенного пектина?
8. Что такое пектин? При производстве каких пищевых продуктов применяют пектин и почему?
9. Расскажите о вреде и пользе пектина.
10. Какие методы могут применяться для выделения полисахаридов?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В МУКЕ ЗЛАКОВЫХ И БОБОВЫХ КУЛЬТУР

**Цель работы:** определить массовую долю белка в муке злаковых и бобовых культур.

### 4.1 Теоретические положения

Одной из мировых проблем при постоянно увеличивающемся населении Земли является нехватка продуктов питания, в особенности белковой составляющей рациона человека. По данным ВНИИ питания РАМН за последние 20 лет дефицит пищевого белка в России превысил 1 млн. т в год. Дефицит белка уменьшает устойчивость организма к инфекциям, так как снижается уровень образования антител. Нарушается синтез и других защитных факторов – лизоцима и интерферона, из-за чего обостряется течение воспалительных процессов. Кроме того, белковая недостаточность часто сопровождается авитаминозом В12, А, Д, К, что также влияет на состояние здоровья.

Трудно переоценить обогащающую роль натуральных биокорректоров, к которым относят растения – аккумуляторы эссенциальных веществ. Растительное биологически активное сырье улучшает питательные и лечебные свойства пищи, а регулярное потребление обогащенных продуктов снижает отрицательные последствия неблагоприятных факторов внешней среды и способствует поддержанию гомеостаза [14].

Перспективным сырьем для получения такого функционального пищевого ингредиента, как белок, являются злаковые и бобовые культуры [15].

Для количественного определения белка в природном сырье описан ряд колориметрических, спектрофотометрических, флуориметрических методов: метод Лоури, метод Брэдфорда, биуретовый метод. Также широкое распространение получил метод определения белка по содержанию азота (метод Кьельдаля).

Метод количественного определения белков, используемый в данной работе (биуретовый), основан на их способности реагировать в щелочной среде с сернокислой медью по месту пептидных связей. При этом образуются солеобразные комплексные соединения, окрашивающие раствор в сине-фиолетовый или красно-фиолетовый цвет. Реакцию дают все белки и полипептиды, начиная с тетрапептидов. Такое же окрашивание дает при взаимодействии с сернокислой медью в щелочной среде биурет (рисунок 4.1).

Окрашенные белковые растворы центрифугируют (фильтруют), определяют их оптическую плотность, а затем по калибровочной кривой определяют в них концентрацию белка. Зная объем раствора, концентрацию белка и вес муки рассчитывают содержание белка.



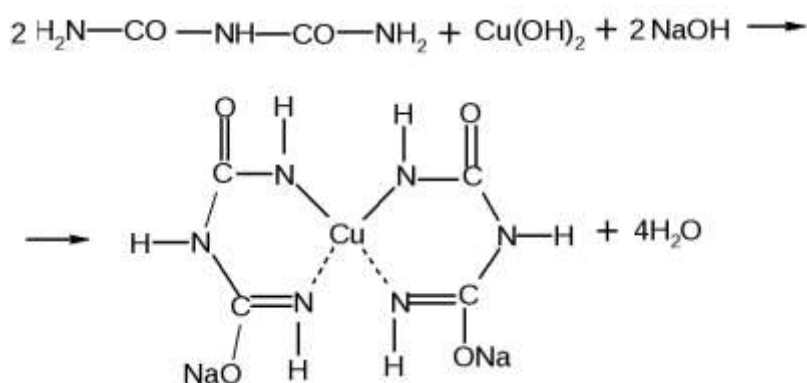


Рисунок 4.1 – Биуретовая реакция на пептидную связь

#### 4.2 Задание:

1. Измерить массовую долю белка в муке разных видов злаковых и бобовых культур: овес, рис, просо, люпин, бобы.
2. Сопоставить полученные результаты и формулировать выводы.

#### 4.3 Порядок выполнения работы

**Материалы и реактивы:** вода дистиллированная, натрий-калий виннокислый ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), едкий натр ( $\text{NaOH}$ ), медь сернокислая ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), калий йодистый ( $\text{KI}$ ), 96%-ный этиловый спирт, мочевины, тимол, активированный уголь, чистый растительный белок.

**Оборудование, лабораторная посуда:** химические стаканы, колбы мерные на 10, 100, 200, 1000 мл, пробирки, пипетки или дозаторы, ступка с пестиком, весы аналитические, водяная баня, спектрофотометр.

##### Ход работы:

*4.3.1. Приготовление биуретового реактива, стандартного раствора белка, растворов  $\text{NaOH}$  и мочевины*

Для приготовления биуретового реактива 9 г калия-натрия виннокислого поместить в химический стакан и растворить в  $400 \text{ см}^3$  0,2 М раствора  $\text{NaOH}$ , затем в полученный раствор добавить 3 г сернокислой меди и перемешать его до полного растворения внесённого реактива. На следующем этапе в образовавшийся раствор добавить 5 г йодистого калия и полученную смесь перемешать до полного растворения йодида калия (при необходимости смесь нагреть). После охлаждения полученный раствор перенести количественно в мерную колбу на  $1 \text{ дм}^3$  с использованием 0,2 М раствора  $\text{NaOH}$ , довести объём раствора в колбе до метки и содержимое колбы тщательно перемешать. Биуретовый реактив хранить в тёмной склянке.

Для приготовления 0,2 М раствора едкого натра 8 г  $\text{NaOH}$  поместить в термостойкий стакан и растворить в дистиллированной воде; после охлаждения полученный раствор перенести в мерную колбу на  $1 \text{ дм}^3$ , довести объём в колбе до метки дистиллированной водой и содержимое колбы тщательно перемешать.

Для приготовления 4%-ного раствора едкого натра 4 г  $\text{NaOH}$  поместить в термостойкий стакан и растворить в дистиллированной воде; после охлаждения

полученный раствор перенести в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup>, довести объём в колбе до метки дистиллированной водой и содержимое колбы тщательно перемешать.

Для приготовления спиртового раствора щёлочи в мерную колбу на 200 см<sup>3</sup> прилить 100 см<sup>3</sup> 96%-ного этилового спирта и довести объём в колбе до метки 4%-ным раствором NaOH, затем содержимое колбы тщательно перемешать.

Для приготовления раствора мочевины в химический стакан объёмом 1 дм<sup>3</sup> поместить 300 г мочевины и 0,5 г тимола, прилить 700 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и полученную смесь нагреть до полного растворения мочевины и тимола. Затем в раствор добавить 3 г активированного угля, тщательно его перемешать и профильтровать в мерную колбу на 1 дм<sup>3</sup>; объём раствора в колбе довести до метки дистиллированной водой и содержимое колбы тщательно перемешать.

Для приготовления стандартного белкового раствора 0,4 г чистого растительного белка растворить дистиллированной водой в мерной колбе на 100 см<sup>3</sup>, в результате чего образуется белковый раствор с концентрацией белка 4 мг/см<sup>3</sup>.

#### *4.3.2. Построение градуировочного графика*

Для построения градуировочного графика колориметрированию подвергаются окрашенные растворы с известной концентрацией белков. По вертикальной оси откладываются значения оптической плотности окрашенных растворов с известной концентрацией белков, а по горизонтальной оси количество белка в мг, содержащегося в 0,2 см<sup>3</sup> взятого для окрашивания белкового раствора. Набор растворов с известной концентрацией белков приготовить в мерных колбах на 10 см<sup>3</sup>, в которые прилить соответственно 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 6, 8, 10 см<sup>3</sup> стандартного белкового раствора с концентрацией белков 4 мг см<sup>3</sup>. Объём раствора в мерных колбах на 10 см<sup>3</sup> довести до метки спиртовым раствором щёлочи и их содержимое тщательно перемешать.

Из каждой колбы отобрать по 0,2 мл белкового раствора и к нему из бюретки добавить 2,4 см<sup>3</sup> раствора мочевины и 2,4 см<sup>3</sup> биуретового реактива. Содержимое пробирки тщательно перемешать и затем пробирку выдержать в течение 10 мин на водяной бане при температуре 40 °С для формирования устойчивого окрашивания. После охлаждения окрашенный раствор колориметрировать на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 670 нм и толщине фотометрируемого слоя 1 см. По полученным результатам построить градуировочный график. В каждой аликвоте белкового раствора объёмом 0,2 см<sup>3</sup> будет содержаться соответственно 0.12, 0.2, 0.28, 0.36, 0.48, 0.64, 0.8 мг белка.

#### *4.3.3 Определение массовой доли белка в муке бобовых и злаковых культур*

Навеску растительного материала 1–2 г растереть в ступке до получения однородной массы, затем прилить 3 см<sup>3</sup> спиртового раствора щёлочи и полученную смесь интенсивно перемешивать пестиком в течение 15 мин для экстрагирования белков. После этого смесь из ступки перенести в центрифужную пробирку и подвергнуть центрифугированию с центробежным ускорением 5000 g в течение 10 мин. Прозрачную надосадочную жидкость в центрифужной

пробирке перелить в стеклянную пробирку и далее использовать для получения окрашенного раствора.

Для этого в стеклянную пробирку на 20 см<sup>3</sup> с помощью дозирующей пипетки внести 0,2 см<sup>3</sup> белкового раствора, выделенного из растительной пробы, и к нему из бюретки добавить 2,4 см<sup>3</sup> раствора мочевины и 2,4 см<sup>3</sup> биуретового реактива. Содержимое пробирки тщательно перемешать и затем пробирку выдержать в течение 10 минут на водяной бане при температуре 40 °С для формирования устойчивого окрашивания. После охлаждения окрашенный раствор колориметрировать на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 670 нм и толщине фотометрируемого слоя 1 см. После измерения оптической плотности окрашенного белкового раствора по градуировочному графику определить количество белка в аликвоте 0,2 см<sup>3</sup>, взятой для приготовления окрашенного раствора.

Содержание белка (в %) определить по формуле:

$$X = \frac{A \cdot B}{m} \cdot 100, \quad (4.1)$$

где  $A$  – концентрация белка в растворе по калибровочной кривой, мг в 1 см<sup>3</sup>;  $B$  – объем раствора белка, окрашенного биуретом, см<sup>3</sup>;  $m$  – масса навески муки, мг; 100 – коэффициент для пересчета содержания белка в проценты.

### Вопросы для самоконтроля

1. В чем опасность дефицита белка в рационе питания?
2. Какие методы используются для определения содержания белка в растительных объектах?
3. В чем сущность биуретового метода?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ

**Цель работы:** ознакомиться с организацией и оборудованием биотехнологической лаборатории по выращиванию культур клеток, тканей и органов растений; приготовить питательную среду для выращивания культур клеток, тканей и органов растений; выделить эксплант апекса побега картофеля и ввести его *in vitro*; провести клонирование и микрочеренкование отдельных тканей картофеля и моркови; получить каллусные культуры примулы.

### 5.1 Теоретические положения

Применительно к растительным объектам биотехнология традиционно рассматривается в рамках следующих направлений:

- биотехнология производства культуры клеток, тканей и органов растений;
- биотехнология микроклонального размножения особей;
- генная инженерия;
- банк *in vitro* и криоконсервация – способ сохранения генофонда растений.

Клеточные технологии, основанные на культивировании *in vitro* органов, тканей, клеток и изолированных протопластов высших растений, могут облегчить и ускорить традиционный процесс создания новых сортов и видов. Они предлагают принципиально новые пути, такие как соматическая изменчивость, мутагенез на клеточном уровне, клеточная селекция, соматическая гибридизация для создания генетического разнообразия и отбора форм с искомыми признаками. Кроме того, клеточные технологии эффективны в создании безвирусного материала вегетативно размножаемых растений [16].

Термином «микроклонального размножения» называют массовое бесполое размножение растений *in vitro*, при котором полученные особи растений генетически идентичны исходному экземпляру.

Существует несколько моделей микроклонального размножения, каждая из них имеет свои преимущества и недостатки:

а) индукция развития адвентивных побегов непосредственно из ткани экспланта, метод является очень эффективным, все признаки размножаемого образца полностью сохраняются;

б) развитие пазушных побегов основано на снятии апикального доминирования, это наиболее надежный способ, заключающийся в ведении полученной массы побегов на микрочеренки, которые используются в качестве вторичных эксплантов для повторения цикла размножения, введение в питательную среду веществ с цитокининовой активностью приводит к образованию пучков маленьких побегов, пазушные почки дают начало новым побегам, считается, что метод имеет минимальную степень риска для получения однородного потомства;

в) получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза, теоретически этот метод наиболее перспективен с точки зрения коэффициента размножения, однако в процессе дедифференциации появляется риск получить

вегетативное потомство с именованными формами, поэтому рекомендуется избегать длительной каллусной культуры и вести обязательный цитологический контроль растений-регенерантов.

*Каллусная культура* – это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дифференцированных (потерявших специализацию) клеток (рисунок 5.1). Каллус может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах), так и на целом растении при поражении.

Каллусная ткань аморфна и не имеет анатомической структуры и может быть разной консистенции: рыхлой, состоящей из сильно оводненных клеток, легко распадающихся на отдельные рыхлые агрегаты; средней плотности с хорошо выраженными отдельными меристематическими очагами; плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

*Меристема* – это клетки в растительном организме, которые постоянно растут, делятся, из которых может сформироваться любая часть материнского организма или целый организм.

*Камбий* – образовательная ткань в стеблях и корнях преимущественно двудольных и голосеменных растений, дающая начало вторичным проводящим тканям и обеспечивающая их прирост в толщину [17].



Рисунок 5.1 – Каллус *Nicotiana tabacum*

Обязательным условием дедифференцировки ткани и превращения ее в каллус является присутствие в питательной среде фитогормонов: ауксинов и цитокининов. При помещении фрагмента ткани или органа растения на питательную среду соответствующего состава может происходить дедифференциация соматических клеток с образованием каллусной ткани.

Для получения каллусной ткани могут быть использованы различные экспланты (рисунок 5.2).

Ауксины вызывают процессы дифференцировки клетки, запуская механизмы активизации вторичных мессенджеров, способствующих растяжению клеточных стенок и дальнейшую пролиферацию, а цитокинины вызывают деление уже дифференцированных клеток. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла

их дедифференцировка, т.е. клетки должны как бы возвратиться в меристематическое состояние [18].

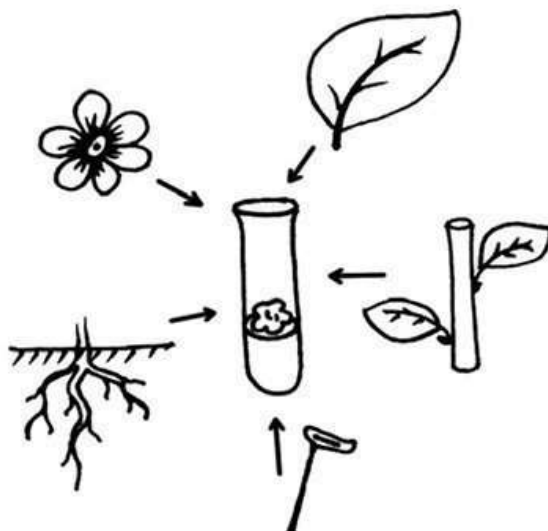


Рисунок 5.2 – Получение каллусной ткани из различных эксплантов: фрагментов стебля, корня, листа, лепестков, тычинок

Размножение дедифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

Эффект, вызываемый действием одних и тех же фитогормонов, может быть различным в зависимости от физиологической характеристики ткани-мишени. Её компетентность определяется степенью дифференцировки клеток.

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов (эпигеномной изменчивостью). Активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению в белковом составе клеток. В каллусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают или уменьшаются в количестве белки, характерные для фотосинтезирующих клеток листа.

Дедифференцировка начинается с использования запасных веществ и разрушения специализированных клеточных органелл. Через 6–12 ч после индукции дедифференцировки клеточная оболочка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, возрастает число элементов аппарата Гольджи, увеличиваются размеры и число ядрышек. Все эти изменения предшествуют началу делений, которые начинаются через 48–72 часа.

Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки.

Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирание каллусных клеток, первичный каллус, возникший на эксплантах, через 4–6 недель переносят на свежую питательную среду – пассируют. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение нескольких лет.

Каллусные клетки *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические черты, свойственные нормальным клеткам, входящим в состав растительного организма, а именно:

- Каллусные клетки сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов.
- Морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным от морозостойких растений.
- Этим свойством не обладают каллусные ткани, полученные от тропических и субтропических культур.
- Каллусным тканям свойственна и фотопериодическая реакция, что связано с сохранением активности фитохромов.
- Общим у каллусных и нормальных клеток растения является и еще ряд признаков, в частности, устойчивость к действию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению.

Вместе с тем каллусные клетки обладают отдельными свойствами, отличающими их от нормальных:

- В них появляются специфические белки, и уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листа, или они совсем исчезают.
- Каллусные клетки отличаются большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.
- В результате выхода из-под контроля организма рост каллусных клеток происходит неорганизованно, асинхронно, и является неограниченным.
- Клеточный цикл у каллусных клеток более длительный, чем у растений, произрастающих в открытом грунте.
- Особенностью каллусных клеток является гетерогенность по возрасту.
- В каллусной ткани одновременно присутствуют клетки молодые в G1-фазе, старые в G2- и S-фазах цикла клеточных делений.
- Значительные отличия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток. Они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными.
- Митохондрии в каллусных клетках так же, как и в меристематических, являются слабо развитыми, в них мало крист, что не может не оказывать влияния на активность аэробного дыхания.
- Наряду с изменением характера дыхания в каллусных клетках в направлении усиления бескислородного расщепления углеводов происходит также сдвиг в сторону пентозофосфатного пути, который является источником пентоз, необходимых для делящихся клеток.

- Опухолевые клетки, в отличие от каллусных, могут расти на питательных средах, лишенных фитогормонов (ауксина, гетероауксина и др.).
- Они не могут образовывать нормально организованные вегетативные органы.
- И в некоторых случаях из них могут возникать уродливые органоподобные структуры, поэтому для размножения их применять нельзя [19].

Регенерация растения из каллуса основана на тотипотентности.

*Тотипотентность* – это свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития с образованием целого организма. Сущность его состоит в том, что если растительная клетка изолируется, она ведет себя подобно клетке зародышевого мешка, то есть образует эмбрионид (зародыш, образующийся неполовым путем из соматической клетки растения) и целое растение.

Тотипотентность культивируемых клеток свидетельствует том, что генетическая информация сохраняется. Но для ее реализации требуются специфические условия. К числу факторов, способных полностью или хотя бы частично восстановить замаскированную генетическую информацию, относятся *свет, регуляторы роста, предшественники и элементы питания*.

Кроме этого важны *температура, влажность, освещенность и периодическое обновление питательной среды*, так как по мере роста клеток в ней накапливаются продукты метаболизма, что неблагоприятно действует на культуру. Поэтому данная методика связана с пересадками, т.е. с переносом части биомассы на новую среду в другом сосуде («пассажи»).

При культивировании растительные клетки имеют более низкие темпы размножения, чем микробиологические объекты, поэтому продолжительность культивирования определяется не десятками часов, а десятками суток.

Сущность метода выращивания растений *in vitro*: растительная, выделенная из любого органа растения ткань (эксплант) помещается на питательную среду, компоненты которой подбираются так, что они поддерживают нормальную жизнедеятельность клетки и стимулируют деление. Поэтому культивировать эти клетки можно только на сложных питательных средах, содержащих соли азота, калия, магния, фосфора и ряд микроэлементов, из органических веществ – углеводы, аминокислоты, витамины, фитогормоны (кинетин, индолилуксусная кислота).

Наиболее часто используемыми в лабораторной практике средами для экспериментов на культуре растительных клеток являются среда Мурасиге-Скуга (Murashige-Skoog, MS) и среда Гамборга В-5. Компонентный состав среды MS приведен в таблице 5.1.



Таблица 5.1 – Компонентный состав среды Мурасиге-Скуга

Наименование ингредиента	Содержание ингредиента, мг/дм <sup>3</sup>
<i>Основные соли (макроэлементы)</i>	
Нитрат аммония (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650
Хлорид кальция (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	440
Сульфат магния (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	370
Гидрофосфат калия (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170
Нитрат калия (KNO <sub>3</sub> )	1900
<i>Минорные соли (микроэлементы)</i>	
Борная кислота (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6,2
Хлорид кобальта (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0,025
Сульфат меди(II) (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0,025
Сульфат марганца(II) (MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	22,3
Йодид калия (KI)	0,83
Молибдат натрия (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0,25
Сульфат цинка (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	8,6
<i>Витамины и органические вещества</i>	
Витамин В8 (мезоинозит)	100
Витамин РР (никотиновая кислота)	0,5
Витамин В6 (пиридоксин)	0,5
Витамин В1 (тиамин хлорид)	0,1
Глицин	2
<i>Фитогормоны</i>	
Гетероауксин	1–30
Кинетин (цитокинин)	0,04–10

Компонентный состав среды Гамборга В-5 приведен в таблицах 5.2–5.5.

Таблица 5.2 – Состав среды Гамборга В-5 (1000 см<sup>3</sup>), рН 5,6-5,8

Компоненты	Масса, объем
Сахароза 2%	20 г
Макросоли по Гамборга В-5	100 см <sup>3</sup>
Витамины по Гамборга В-5	10 см <sup>3</sup>
Микроэлементы по Гамборга В-5	1 см <sup>3</sup>
Fe-хелат	5 см <sup>3</sup>

Таблица 5.3 – Макросоли для питательной среды Гамборга В-5

Элементы, соли, вещество	Масса, г	
	1000 см <sup>3</sup>	2000 см <sup>3</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,69	3,38
KNO <sub>3</sub>	25	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,34	2,68
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,5	5,0
CaCl <sub>2</sub>	1,5	3,0

Таблица 5.4 – Микросоли для питательной среды Гамборга В-5

Компоненты	Масса, г		
	100 см <sup>3</sup>	500 см <sup>3</sup>	1000 см <sup>3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3	1,5	3
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5	1,0	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,025	0,125	0,25
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,125	0,25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0025	0,0125	0,025
KI	0,065	0,375	0,75

Таблица 5.5 – Витамины для питательной среды Гамборга В-5

Витамин	Масса, мг		
	100 см <sup>3</sup>	500 см <sup>3</sup>	1000 см <sup>3</sup>
Тиамин	100	500	1
Пиридоксин	10	50	0,1
Никотиновая кислота	10	50	0,1
Мезоинозит	1 г	5 г	10

Каллусные клетки имеют различную форму. При каллусогенезе в мембранах возрастает содержание насыщенных жирных кислот, и исчезают ненасыщенные, имеет место процесс дифференцировки, т.е. переход клеток на уровень изолированной клетки.

Каллус можно получить из ряда растительных тканей. Молодые клетки более пригодные для этой цели, чем зрелые, это особенно заметно на листьях. Кусочки стебля древесных пород – плохой материал для каллуса. Любой вид растения дает каллус при соблюдении определенных методических приемов культивирования.

В клетках экспланта, состоящего из неделящихся специализированных клеток, в самом начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, связанные с травматическими синтезами, с дедифференцировкой и подготовкой к процессу деления. Можно предположить, что травма приводит к высвобождению из клеток биологически активных веществ – индукторов клеточного деления, отличающихся по своей природе от известных стимуляторов роста (ауксинов, гиббереллинов).

В культуре тканей можно размножить растения и получать оздоровленный (безвирусный) посадочный материал. Для оздоровления растений используют культуру апексов или культуру апикальных меристем, так как в стеблевой апекс вирусы проникают медленнее, чем в другие части растений. При культивировании апексов размножение вирусов подавляется реакцией растительного организма на травму, вызванную отсечением верхушки.

В *in vitro* используются апексы верхушечных и боковых почек (точек роста), кончиков корней (особенно проростков). *Апикальная меристема* – группа

меристематических (образовательных) клеток, организованных в ростовой центр, занимающая терминальное положение в побеге или корне и обеспечивающая образование всех органов и первичных тканей. Верхняя часть апикальной меристемы представлена инициалами (единственной клеткой – у хвощей и многих папоротников и многоклеточной структурой – у семенных растений). Ближайшие производные инициальных клеток часто выделяют в зону протомеристемы. Вслед за ней лежат ткани, уже частично дифференцированные, но всё ещё находящиеся в меристематическом состоянии, которые относят к частично детерминированной первичной меристеме. В зависимости от производимых ею систем тканей детерминированная меристема включает следующие клеточные комплексы: тунику, образующую в дальнейшем первичную покровную ткань (эпидермис) и часть первичной коры, и корпус, клетки которого постепенно формируют комплекс проводящих тканей (центральный цилиндр); в корне – дерматоген, дифференцирующийся в первичную покровную ткань (ризодермис); периблему – будущую первичную кору; плерому – центральный цилиндр. Таким образом, будущий ход развития меристематических тканей частично детерминирован уже самим размещением их в апексе побега и корня. Апикальная меристема в верхушечной почке побега элодеи представлена на рисунке 5.3.

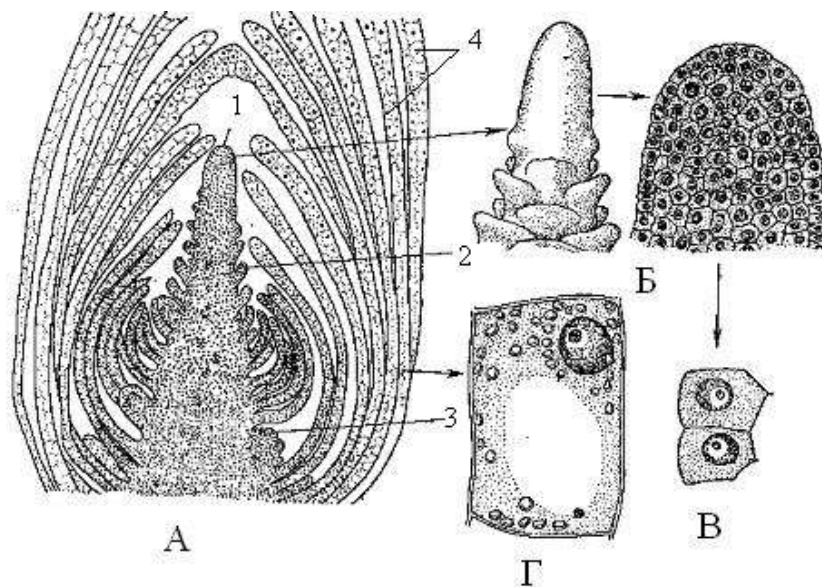


Рисунок 5.3 – Апикальная меристема в верхушечной почке побега элодеи (*Elodea canadensis*): А – продольный разрез; Б – конус нарастания (внешний вид и разрез); В – клетка первичной меристемы; Г – клетка из сформировавшегося листа (1 – конус нарастания, 2 – первичный бугорок, 3 – вторичный бугорок – бугорок пазушной почки, 4 – примордии – зачаточные листья)

Обычно на питательные среды высаживают небольшую часть меристемы до 0,5 мм. В целом закономерность такова: чем меньше величина меристемы, тем больше вероятность получения безвирусных растений. Ее выделение осуществляется в ламинар-боксе с использованием препаровальных инструментов под увеличением бинокулярного микроскопа.

Преимущества использования культур клеток растений в производстве БАВ:

- ✓ получение экологически чистых продуктов независимо от климата, сезона, погоды;
- ✓ создание клеточных линий – сверхпродуцентов (БАВ: антоцианы, антрахиноны, берберин, розмариновая кислота, шиконин, аймалицин, гинзенозиды, никотин);
- ✓ создание редких и исчезающих растений – продуцентов;
- ✓ экономия производственных площадей;
- ✓ возможность оптимизировать и стандартизировать условия выращивания;
- ✓ возможность автоматизации процессов.

#### *Организация лаборатории по культивированию клеточных культур растений*

Для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные изолированные помещения, а также современное оборудование и высококачественные реактивы. Для удобства проведения дезинфекции полы, стены и потолок в помещениях должны иметь водостойкое и ультрафиолетоустойчивое покрытие.

Оборудование моечного помещения: мойки с горячей и холодной водой; дистиллированная вода; дистилляторы и бидистилляторы; сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды – до 100–130 °С, для инструментов – до 170 °С; шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, емкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы с эксикаторами для хромпика ( $H_2SO_4$  98 % +  $K_2CrO_7$ ).

Оборудование помещения для приготовления питательных сред: лабораторные столы; холодильники для хранения маточных растворов солей, гормонов и витаминов; аналитические и торсионные весы; иономер; магнитные мешалки; плитки, газовые горелки; набор посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, мензурки, пробирки и др.), необходимый набор химических реактивов надлежащей степени чистоты (ХЧ, Ч, ЧДА).

Оборудование помещения для стерилизации: автоклавы с режимом работы – давление 1–2 атм и температура 120 °С; стеллажи для штативов с питательными средами; шкафы для хранения стерильных материалов. Данное помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава.

Оборудование помещения для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды: ламинар-боксы, лабораторные столы, стеллажи, бактерицидные лампы, шкафы для материалов и оборудования.

Оборудование культуральных помещений: световое отделение – источники освещения со спектром близким к спектру дневного света (от 3 до 10 kLx), кондиционер для регуляции температуры ( $25 \pm 2$  °С) и влажности воздуха (70 %), стеллажи для штативов с культивируемым материалом; темновое отделение – с тем же оборудованием, исключая источники освещения. Для культивирования эксплантов на питательной среде желательно использовать термостаты или

хладотермостаты, способные с высокой точностью поддерживать задаваемые режимы температуры и влажности воздуха.

Необходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории: мерные колбы, колбы Эрленмейера, химические стаканы, мерные цилиндры, чашки Петри, пробирки, бутылки, пипетки, стеклянные палочки, стеклянные и мембранные фильтры, ланцеты (в том числе глазные, хирургические, анатомические), ножницы, пинцеты, ножи, бритвенные лезвия, препаровальные иглы, шпатели, бумага (оберточная, пергаментная, фильтровальная), фольга алюминиевая, вата, марля, шпагат.

При работе в стерильном помещении лаборатории все сотрудники бактериологической лаборатории обязаны соблюдать следующие правила работы, которые обеспечивают стерильность в работе и предупреждают возможность возникновения внутрилабораторных заражений:

1. Все лица, находящиеся в лаборатории, должны быть в халатах, сменной обуви (либо бахилах), белой шапочке или косынке.

2. В помещении запрещается прием пищи и курение, хранение продуктов питания.

3. Нельзя вносить в лабораторию посторонние вещи.

4. Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнее платье на халат.

5. Каждый работник должен пользоваться только своим рабочим местом.

6. Все операции должны производиться с соблюдением правил стерильности: все стерильные работы проводят вблизи пламени горелки, переливание зараженных жидкостей производят над лотком с дезинфицирующим раствором и т. п.

7. Нужно строго следить за чистотой рук: по окончании работы с заразным материалом их дезинфицируют. Рабочее место в конце дня приводят в порядок и тщательно дезинфицируют.

8. Весь инвентарь, находившийся в контакте с заразным материалом, подлежит стерилизации или уничтожению.

Биотехнологическую лабораторию необходимо содержать в чистоте. Следует регулярно проводить гигиеническую уборку помещений лаборатории. Обеспечить полную стерильность лаборатории очень трудно и это не всегда необходимо, но значительно снизить количество микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях в лабораторных помещениях возможно. Это достигается путём применения на практике методов дезинфекции, то есть уничтожения возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды.

Для культивирования стерильных проростков необходимо использовать ламинар-боксы, обеспечивающие посадку эксплантов на питательную среду без заражения микроорганизмами.

Все поверхности ламинара обрабатываются 96%-ным спиртом, простерилизованные инструменты, материалы, растительный материал помещают на стол ламинара и включают УФ-излучение. Через 20 минут выключают УФ и включают биофильтры. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный ха-

лат и шапочку, руки обрабатываю 96%-ным спиртом. Пинцеты, скальпели и препаровальные иглы помещают в стакан с 96%-ным спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигают на пламени спиртовки. В случае нарушения стерильности на средах хорошо развиваются микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду, питательные среды стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1–2 атм и температурой 120 °С в течение 20–60 мин в зависимости от объема стерилизуемого материала.

Колбы, штативы со средой, вату, бумагу, халаты перед автоклавированием заворачивают в целлофановую бумагу, либо помещают в биксы.

Металлические инструменты автоклавировать нельзя, так как под действием пара образуется ржавчина. Поэтому их стерилизуют сухим жаром в термостатах с температурой 170–250 °С в течение 1–2 ч.

## 5.2 Задание:

1. Ознакомиться с организацией и оборудованием биотехнологической лаборатории по выращиванию культур клеток, тканей и органов растений.
2. Приготовить питательную среду для выращивания культур клеток, тканей и органов растений – среду Мурасиге-Скуга.
3. Выделить эксплант апекса побега картофеля и ввести его *in vitro*.
4. Провести клонирование и микрочеренкование отдельных тканей картофеля и моркови.
5. Получить каллусные культуры примулы.

## 5.3 Порядок выполнения работы

**Материалы и реактивы:** химические реактивы или готовые маточные растворы макро- и микросолей ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), витаминов (В8, В6, В1, РР), фитогормонов (гетероауксин, кинетин), 96%-ный этиловый спирт, 6%-ный раствор гипохлорита натрия, побеги картофеля, моркови, растения примулы.

**Оборудование, лабораторная посуда:** химические стаканы, колбы, мерные цилиндры от 5 до 2 дм<sup>3</sup>, пробирки, чашки Петри, пипетки от 0,01 до 10 см<sup>3</sup> или дозаторы, весы аналитические до 500 г, весы торсионные до 100 мг, пинцеты, препаровальные иглы, ножницы, шпатели, скальпели, вата, электроплитки, магнитные мешалки, ламинар-бокс, спиртовки.

### Ход работы:

#### 5.3.1 Приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга

В химический стакан емкостью 2 дм<sup>3</sup> поместить 20 г сахарозы, долить дистиллированной водой до 400 см<sup>3</sup> и растворить. Добавить к раствору сахарозы 50 см<sup>3</sup> маточного раствора макросолей, 1 мл микросолей (см. таблица 5.1), 5 см<sup>3</sup> хелата железа, 5 см<sup>3</sup> хлористого кальция. Приготовить агар: навеску 7 г поместить в стакан и залить водой до 200 см<sup>3</sup>, растворить, нагревая плитке или

газовой горелке, при постоянном помешивании. Готовый агар долить к раствору солей.

Питательную среду довести до нужного объема (1 дм<sup>3</sup>) дистиллированной водой. Измерить рН среды: если рН превышает 5,5-6,0, добавить несколько капель 0,1 М НСl, если ниже этого значения – 0,1 М КОН.

Готовую питательную среду разлить в колбы, около 25 см<sup>3</sup>, закрыть их фольгой. Поместить колбы в автоклав и проавтоклавировать.

Металлические инструменты завернуть в плотную бумагу и поместить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при температуре 170–200 °С в течение 2 ч.

Чашки Петри, колбы с питательной средой, вату, марлю, фильтровальную бумагу, колбы с дистиллированной водой (закрытые фольгой) поместить в автоклав. Автоклав привести в рабочее состояние: закрыть плотно крышку, воду залить до метки. Включить автоклав, давление пара довести до метки 1,2 атм (в паровой камере), заполнить паром стерилизационную камеру, вытеснить конденсат в течение 10 мин, при этом давление пара в стерилизационной камере должно быть на уровне 0,1–0,2 атм. Довести давление в стерилизационной камере до 1 атм, включить автоматический режим. Автоклавировать 20 минут при давлении в стерилизационной камере 1–1,2 атм. Отключить автоклав, вытеснить пар из обеих камер довести давление до 0 атм.

Проавтоклавируемые материалы перенести в комнату для пересадки тканей и поместить в шкафы или на стеллажи.

### 5.3.2 Выделение экспланта апекса побега картофеля и введение его *in vitro*

Взять клубни картофеля с растущими «глазками». Отделить растущий побег провести его стерилизацию. Стерилизованный побег (на стерильной чашке Петри) в ламинар-боксе поместить в поле зрения бинокулярного микроскопа. При малом увеличении в центральной части разреза почки найти удлиненный конус нарастания с верхушкой округлой формы. Над конусом нарастания виден как бы свод, образованный зачаточными листьями (примордии), идущими от основания почки.

Препаровальной иглой (режущие иглы от шприца) изолировать апикальную меристему (конус) на 12–13-й пластохроне (промежуток времени между инициациями двух листовых бугорков) и перенести на стерильную среду MS. В культуральной комнате с кондиционированным воздухом поддерживать температуру 25±2 °С, влажность воздуха 70 %, освещенность 5 кЛх и фотопериод 16 ч.

В среднем от посадки меристемы на среду до формирования проростков с 5–6 листочками проходит 30–45 дней, в некоторых случаях от 2 до 8 месяцев. Среды по мере истощения обновляют, и проростки периодически пересаживают на новые среды в стерильных условиях.

### 5.3.3 Клонирование отдельных тканей растений моркови

Подготовить ламинар-бокс и инструменты к работе. Тщательно отмыть морковь под струей воды. Нарезать морковь по 100 мм в длину в стакан и залить стерильным раствором на 30 мин. Перенести в ламинар-бокс.

Отрезать от моркови с обоих концов кусочки размером 2 мм и затем перенести их в чашку Петри. Скальпелем порезать объект на диски толщиной 1 мм и размером 4 мм x 4 мм. Поместить экспланты на питательную среду MS и убрать на темные стеллажи. Проводить наблюдение каждые 7 дней, результаты зарисовать.

#### 5.3.4 Микрочеренкование стерильных проростков картофеля и моркови

Подготовить ламинар-бокс и инструменты к работе. В ламинаре извлечь стерильные проростки из колб. Побеги разделить на микрочеренки (междоузлие с почкой) и посадить в питательную среду на глубину междоузлия. Колбу закрыть пленкой и перенести в культуральную комнату. Результаты зарисовать через 2–4 недели. Сделать выводы о степени пролиферации почек различных сельскохозяйственных культур.

#### 5.3.5 Культивирование каллусных культур примулы

Листья примулы поместить в стерилизующий раствор на 5 мин, затем промыть стерильной дистиллированной водой 3 раза. Стерильным скальпелем вырезать срединную жилку листа с участком паренхимы: длиной 1,5–2 см, шириной 1 см. Поместить экспланты на питательную среду MS (перед каждой манипуляцией инструменты обрабатывать спиртом и обжигать на пламени спиртовки). Колбы с эксплантами перенести на стеллажи для индукций каллусогенеза при температуре  $18 \pm 2$  °C. Результаты зарисовать через 2–4 недели.

### Вопросы для самоконтроля

1. Назовите основные направления биотехнологии растений.
2. Дайте определения микроклонального размножения растений, каллусной культуры, меристемы, экспланта.
3. Какие стерилизующие растворы используются для растительных эксплантов?
4. Назовите основные питательные среды, используемые для выращивания клеток, тканей и органов растений.
5. Какие вещества входят в состав питательных сред, и какую функцию они выполняют в культуре клеток и тканей *in vitro*?
6. Назовите преимущества использования культур клеток растений в производстве БАВ.



## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. ПОЛУЧЕНИЕ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

**Цель работы:** приготовить биоразлагаемые пленки на основе комбинаций растительных полисахаридов и изучить их физико-химические свойства.

### 6.1 Теоретические положения

В последние годы все больше исследований в сфере упаковки направлено на использование биоразлагаемых материалов. Биоразлагаемые материалы – это класс полимеров, которые образуются в результате жизнедеятельности растений, животных или в процессе биосинтеза в клетках живых организмов, которые могут разрушаться в естественных условиях под воздействием таких природных факторов, как свет, температура, влага, а также при участии микроорганизмов. По сравнению с традиционными пластиковыми полимерами они имеют определенные преимущества, такие как экологичность, способность к биологическому разложению, биосовместимость и др. [20, 21].

Биоразлагаемые пленки и покрытия отличаются между собой способами получения и применения. Так, покрытия доступны в жидком виде и наносятся непосредственно на поверхность продуктов, где после сушки образуется тонкий защитный слой, в то время как пленки формируются и сушатся отдельно от продукта, а затем используются в качестве индивидуальной упаковки или оберточного материала [22].

Компоненты биоразлагаемых пленок и покрытий, используемых в пищевой промышленности, должны быть безопасными в соответствии с предполагаемыми условиями обработки и применения, а также соответствовать требованиям установленных нормативных документов. Так, в США продовольственные материалы должны иметь одобрение «Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) или, по крайней мере, иметь статус «Признанный полностью безвредным» (Generally Recognized as Safe, GRAS). Основным документом Европейского союза в области безопасности пищевых продуктов является Регламент № 178/2002 Европейского парламента и Совета Европейского союза от 28 января 2002 г. Регламентом учреждается Европейское агентство по безопасности продовольствия (European Food Safety Agency, EFSA). В России решения принимает Госкомсанэпиднадзор РФ [23].

Основная миссия упаковки – поддерживать качество и безопасность пищевых продуктов во время хранения, транспортировки и увеличивать их срок годности, защищая продукты от микроорганизмов и соответствующих им токсинов, внешних физических и химических воздействий.

К биоразлагаемым пленкам и покрытиям, используемым в пищевой промышленности, предъявляется ряд требований, они должны:

- быть безопасными, нетоксичными и экологически чистыми;

- обеспечивать структурную защиту от физического, химического и биологического разрушения;
- проявлять высокие барьерные свойства против газов, паров, растворенных веществ и липидов;
- улучшать органолептические и физико-химические показатели пищевых продуктов;
- служить носителем функциональных и пищевых добавок;
- иметь простую технологию производства;
- обладать низкой стоимостью сырья и обработки [24, 25].

Основными компонентами биоразлагаемых пленок и покрытий являются полисахариды, белки, липиды и различные добавки (рисунок 6.1).



Рисунок 6.1 – Компоненты биоразлагаемых пленок и покрытий

Физико-химические характеристики этих компонентов различны, поэтому они влияют на функциональные особенности формируемых материалов.

*Полисахариды* представляют собой природные полимеры (крахмалы, производные целлюлозы, пектины, пуллулан, альгинаты, каррагинаны, хитозан, камеди и др.), широко используемые для получения биоразлагаемых пленок или покрытий. Пленки на основе полисахаридов обладают эффективными барьерными свойствами против кислорода, посторонних запахов, липидов, имеют приемлемую механическую прочность, однако из-за своей гидрофильной природы проявляют слабые барьерные свойства против водяного пара.

Полисахаридные пленки и покрытия могут применяться для увеличения срока хранения фруктов, овощей, молочных продуктов, рыбы или мяса. Они значительно снижают обезвоживание, потемнение поверхности и окислительную прогорклость продуктов.

Из полисахаридов наибольшую популярность для получения биоразлагаемых пленок приобрели альгинат натрия, каррагинан, пектин, агар-агар.

*Альгиновая кислота* – главный структурный компонент клеточных стенок бурых и красных морских водорослей родов *Laminaria* и *Macrocystis*. Альгинаты представляют собой линейные анионные водорастворимые полисахариды, состоящие из мономерных звеньев D-маннуроната (M) и L-гулуроната (G) (рисунок 6.2, а, б). Полимерная цепь альгината состоит из трех видов блоков в разных пропорциях и разных распределений в цепочке (рисунок 6.2, в). Физические свойства альгинатов зависят от относительной доли этих трех блоков. Блоки G содержат только единицы, полученные из L-гулурановой кислоты, которые вызывают большую прочность геля, M-блоки основаны на D-маннуроновой кислоте, а блоки MG состоят из вспомогательных единиц D-маннуроновой и L-гулурановой кислот. Блоки M и G известны как гомополимерные, а блоки MG – гетерополимерные.

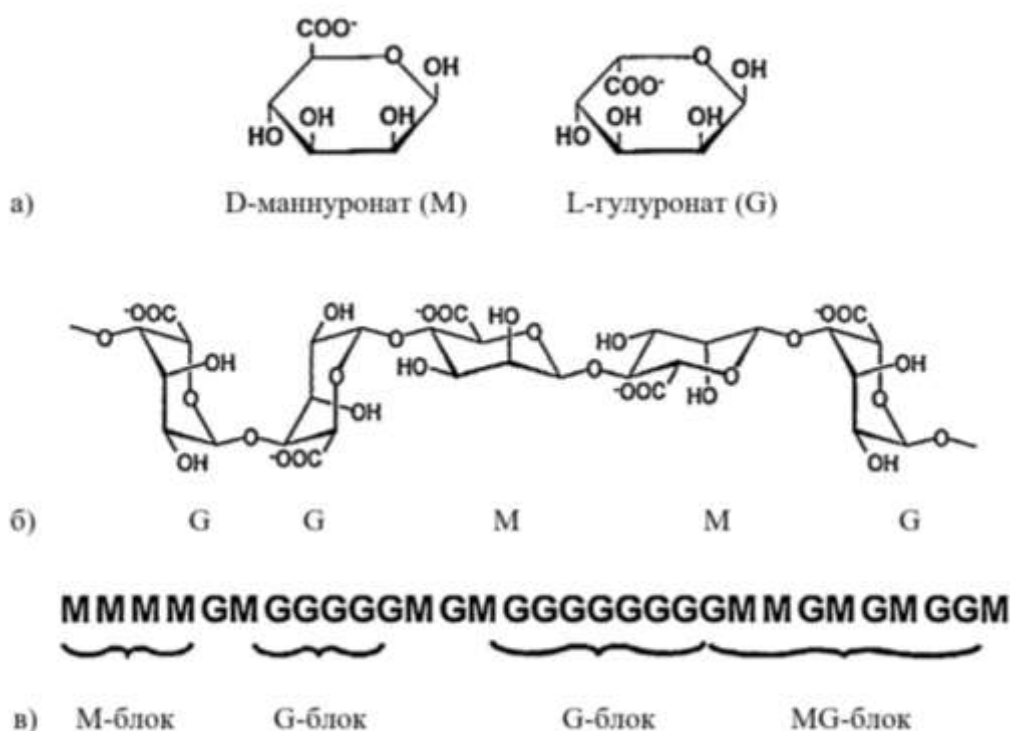


Рисунок 6.2 – Химическое строение альгинатов: (а) мономеры альгината, (б) конформация цепи, (в) распределение блоков

Соотношение и последовательность мономеров определяет физические свойства альгината и зависит от вида, части и возраста водорослей, из которых его выделяют.

Соли альгиновой кислоты – альгинаты (альгинат натрия (E401), альгинат калия (E402) и альгинат кальция (E404)) – находят широкое применение в пищевой промышленности в качестве пищевых добавок. Они предотвращают обезвоживание мяса, рыбы и фруктов, используются в качестве сгущающих, гелеобразующих и стабилизирующих агентов.

Альгинат является привлекательным пленкообразующим полимером из-за биоразлагаемости, нетоксичности, биосовместимости и низкой стоимости. Самым полезным и уникальным свойством альгинатов является их способность реагировать с катионами поливалентных металлов, в частности, с ионами кальция. Эти ионы способствуют образованию связей между блоками М и G. Длина G-блоков определяет способность формирования этих взаимодействий. Диффузия ионов в раствор альгината вызывает процесс анионного обмена, в котором водорастворимый альгинат (натрия или калия) должен обменивать свои противоионы с  $\text{Ca}^{2+}$  с образованием золя или геля. В результате такого взаимодействия могут быть значительно улучшены механические и барьерные свойства пленок [26].

*Каррагинаны* – это натуральные гидрофильные полимеры линейной структуры, представляющие собой частично сульфатированные галактаны. Каррагинаны экстрагируются из клеточных стенок различных красных морских водорослей (например, *Кларификус алварезии*, *Кларификус стриятум*, *Еукеума дентикулатум*, *Хондрис криспус*).

Каррагинаны представляют собой водорастворимые полимеры. Наиболее важным структурным отличием, влияющим на их свойства, является количество и положение сульфатных эфиров на повторяющихся субъединицах галактозы (рисунок 6.3). Чем больше сульфатных эфиров, тем ниже температура растворения и способность к гелеобразованию.

Лямбда ( $\lambda$ )-каррагинан в воде образует вязкие растворы, способен формировать гели в смеси с белками, используется для загущения молочных продуктов, имеет три сульфатные группы на две молекулы галактозы, его получают, в основном, из водоросли *Гигартина*.

Йота ( $\iota$ )-каррагинан образует мягкие гели, содержит две сульфатные группы на две молекулы галактозы, производится из *Еукеума спиносум*.

Каппа ( $\kappa$ )-каррагинан образует сильные, твёрдые гели, содержит одну сульфатную группу на две молекулы галактозы, производится из *Кларификус коттони*

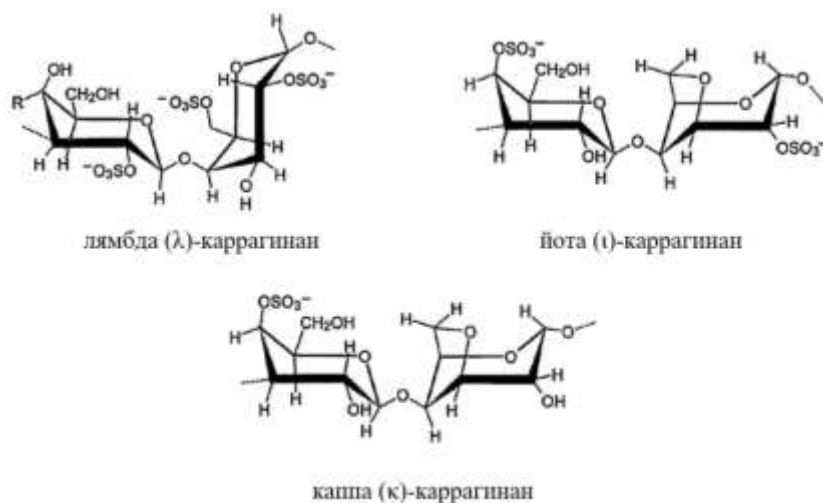


Рисунок 6.3 – Химическое строение каррагинанов

κ-Каррагинан является одной из наиболее распространенных форм каррагинанов, которые используются при производстве пищевых продуктов. Он имеет двойную спиральную конформацию, линейные спиральные части могут связываться и образовывать трехмерный слой в присутствии соответствующих катионов ( $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^+$ ). κ-Каррагинан также способен взаимодействовать с различными пищевыми белками посредством электростатических взаимодействий и повышать их агрегационную устойчивость. Каррагинан имеет большой потенциал для образования пленок и покрытий [27].

Еще одним полимером, экстрагируемым из красных и бурых морских водорослей (*Ceramium*, *Phyllophora*, *Gracilaria*, *Gelidium*), является агар. Он представляет собой смесь полисахаридов агарозы и агаропектина (рисунок 6.4).

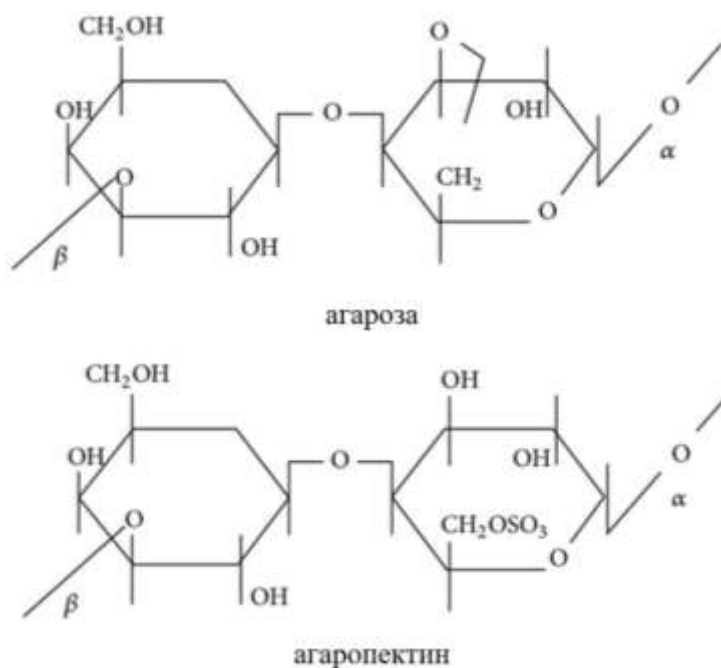


Рисунок 6.4 – Структурные компоненты агара

Агар используют в микробиологии при приготовлении плотных питательных сред, применяемых для культивирования и диагностики бактерий, а также в фармацевтическом производстве, косметологии и пищевой промышленности (пищевая добавка E406), как стабилизатор, загуститель и желирующее вещество (особенно в кондитерской промышленности). Пленки на основе агара получают глянцевыми, прозрачными и гибкими [28].

*Пектин* является одним из основных компонентов клеточной стенки растений и способствует поддержанию целостности и жесткости тканей. Химическая структура пектина представляет собой полигалактуроновую кислоту (рисунок 6.5), с различной степенью метилирования ( $-\text{CH}_3$ ) и / или амидирования ( $-\text{NH}_2$ ) её карбоксильных групп.

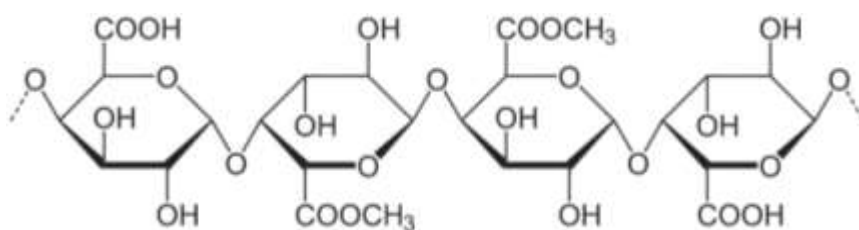


Рисунок 6.5 – Химическое строение пектина

Пектин широко используется в пищевой промышленности в качестве гелеобразователя, стабилизатора или загустителя таких продуктов как джемы, йогурты, фруктовые и молочные напитки, мороженое и др. Он зарегистрирован в качестве пищевой добавки E440.

В медицине и фармацевтической промышленности пектин используется для капсулирования лекарств и в качестве физиологически активного вещества, оказывающего положительное воздействие на организм человека.

Производство пленок и покрытий на основе пектина может быть выполнено с помощью методов литья, экструзии, распыления и погружения [29].

## 6.2 Задание:

1. Приготовить пленки на основе растительных полисахаридов: агар-агара, альгината натрия, пектина, к-каррагинана.
2. Измерить массовую долю влаги в полученных пленках гравиметрическим методом.
3. Изучить растворимость пленок в воде.
4. Изучить химическую стойкость пленок в этиловом спирте, разбавленных и концентрированных растворах кислот и щелочей.
5. Изучить деградацию пленок в модельных биологических средах, имитирующих желудочный и кишечный соки.

## 6.3 Порядок выполнения работы

**Материалы и реактивы:** вода дистиллированная, глицерин, агар-агар, альгинат натрия, пектин, к-каррагинан, фосфатный буферный раствор с pH 7,5, натрий хлористый, пепсин, панкреатин, азид натрия, 96%-ный  $C_2H_5OH$ , 0,1 М и 2 М растворы NaOH, 0,1 М и 6 М растворы  $H_2SO_4$ , 0,1 М и 6 М растворы HCl, 0,1 М и 8,75 М растворы  $CH_3COOH$ .

**Оборудование, лабораторная посуда:** химические стаканы, колбы, мерные цилиндры, пробирки, чашки Петри диаметром 9,0 см, весы аналитические, сушильный шкаф, магнитная мешалка, бумажные фильтры, электронный секундомер.

### Ход работы:

#### 6.3.1 Приготовление пленок на основе растительных полисахаридов

Исследуемые полисахариды и пластификатор (глицерин) растворить в дистиллированной воде и тщательно перемешать с использованием магнитной мешалки до получения однородных растворов. Использовать рецептуры пле-

нок, приведенные в таблице 6.1. Далее растворы нагреть в зависимости от вида полимера до  $75\pm 5$  °С (альгинат натрия, пектин) и  $95\pm 5$  °С (агар-агар, каррагинан) в течение 15 мин. Пленки получить наливным методом, используя в качестве подложки чашки Петри диаметром 9,0 см,  $15\text{--}20$  см<sup>3</sup> пленкообразующего раствора разлить в чашки Петри и высушить в сушильном шкафу при температуре  $50\pm 5$  °С в течение  $10\pm 2$  ч. Высушенные пленки отделить с поверхностей чашек и хранить при комнатной температуре.

Таблица 6.1 – Составы растворов для получения пленок

Компоненты пленки, масс. %			
	полисахарид	глицерин	вода
агар-агар	2,0	2,0	96,0
	3,0	2,0	95,0
	4,0	2,5	93,5
альгинат натрия	2,0	2,0	96,0
	3,0	2,0	95,0
	4,0	2,5	93,5
κ-каррагинан	2,0	2,0	96,0
	3,0	2,0	95,0
	4,0	2,5	93,5
пектин	1,0	1,0	98,0
	2,0	2,0	96,0
	3,0	2,0	95,0

### 6.3.2 Измерение массовой доли влаги в полученных пленках

Предварительно взвешенные кусочки пленки ( $2\times 2$  см) высушить в сушильном шкафу при  $105$  °С до достижения постоянного веса. Массовую долю влаги (МС) рассчитать по формуле:

$$MC = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \cdot 100, \quad (6.1)$$

где  $m_0$  – начальная масса пленки,  $m_1$  – масса пленки после высушивания.

### 6.3.3 Изучение растворимости пленок в воде

Предварительно высушенные и взвешенные кусочки пленки ( $2\times 2$  см) поместить в  $40$  см<sup>3</sup> дистиллированной воды при  $25$  °С и постоянном перемешивании ( $60$  об/мин) и выдержать в течение  $24$  ч. Далее растворы профильтровать через предварительно высушенные до постоянной массы бумажные фильтры. Остатки пленки совместно с фильтром высушить при  $105$  °С в течение  $24$  ч и взвесить. Растворимость пленок в воде (WS, %) рассчитать с помощью формулы:

$$WS = \frac{m_1 - (m_2 - m_f)}{m_1} \cdot 100, \quad (6.2)$$

где  $m_1$  – начальная масса сухой пленки;  $m_2$  – масса высушенного фильтра после фильтрования раствора;  $m_f$  – масса сухого фильтра.

#### *6.3.4 Изучение химической стойкости пленок*

Для каждого образца полученных пленок приготовить квадраты размером 1,0 см. Приготовленные сухие квадраты поместить в заранее подготовленные химические растворы: 96%-ный  $C_2H_5OH$ , 0,1 М и 2 М  $NaOH$ , 0,1 М и 6 М  $H_2SO_4$ , 0,1 М и 6 М  $HCl$ , 0,1 М и 8,75 М  $CH_3COOH$ . Установить продолжительность разложения опытных образцов с помощью электронного секундомера.

#### *6.3.5 Изучение деградации пленок в модельных биологических средах*

Образцы пленок разделить на вертикальные полосы 30,0 x 10,0 мм. Приготовить стерильный фосфатный буфер с  $pH=7,5$ . Параллельно приготовить стерильный 0,9%-ный раствор хлористого натрия. Стерильный раствор, имитирующий желудочный сок, приготовить из 0,9%-ного раствора хлорида натрия с добавлением пепсина 0,3 г/дм<sup>3</sup>, который предварительно растворить в стерильной дистиллированной воде.

Далее в стерильный фосфатный буфер с  $pH=7,4$  внести панкреатин 1,0 г/дм<sup>3</sup>, растворенный в небольшом количестве стерильной воды. Во все приготовленные растворы добавить 1,0 г/дм<sup>3</sup> азида натрия для устранения биоразложения бактериями. Образцы пленок инкубировать в модельных биологических средах в течение 30 сут, оценить и отметить тенденцию изменения качества пленок.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Дайте определение биоразлагаемых полимеров.
2. Какие биополимеры используются для производства биоразлагаемых полимеров?
3. Назовите полисахариды, наиболее часто используемые для производства биоразлагаемых полимеров.
4. Опишите процесс приготовления биоразлагаемых пленок наливным способом.
5. Опишите методику измерения массовой доли влаги в пленках на основе растительных полисахаридов.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антиоксидантные свойства культурных растений Калининградской области: монография / Г. Н. Чупахина, П. В. Масленников, Л. Н. Скрыпник [и др.]. – Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2016. – 145 с.
2. Джапаридзе, Л. А. Старение, геропротекторы, генная терапия / Л. А. Джапаридзе // Региональная экология. – 2019. – № 2 (56). – С. 109–123.
3. Журавлев, А. К. Актуальные вопросы раннего проявления болезней старения, возможности классической и традиционной восточной медицины / А. К. Журавлев, Ю. Ю. Голубев // Живая психология. – 2016. – № 1, Т. 3. – С. 47–52.
4. Шарова, Е. И. Антиоксиданты растений: учеб. пособие / Е. И. Шарова. – Санкт-Петербург: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2016. – 140 с.
5. Исследование компонентного состава лекарственного растительного сырья методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / Е. С. Жестовская, А. М. Антохин, В. Ф. Таранченко, С. В. Василевский и др. // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – С. 149–157.
6. Винокурова, О. А. Сравнительная характеристика различных видов тимьяна: состав, свойства, применение (обзор) / О. А. Винокурова, О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 4(17). – С. 134–150.
7. Гребенникова, О. А. Биологически активные вещества *Scutellaria baicalensis* Georgi коллекции никитского ботанического сада / О. А. Гребенникова, А. Е. Палий, Л. А. Логвиненко // Бюллетень ГНБС. – 2015. – № 117. – С. 60–66.
8. Кочкин, Д. В. Анализ гинзенозидов в корнях женьшеня настоящего (*Panax ginseng*), интродуцированного в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси / Д. В. Кочкин, Е. С. Глаголева, Б. А. Галишев, Е. В. Спиридович // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2018. – № 4 (62) – С. 447–454.
9. Изучение качественного и количественного содержания биологически активных веществ в витаминном сборе крапивы и рябины (обзор) / В. Ю. Жилкина, И. А. Ефимова, А. И. Марахова, О. Н. Донцова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 2 (19). – С. 200–207.
10. Мирович, В. М. Биологически активные вещества растений (полисахариды, эфирные масла, фенологликозиды, кумарины, флавоноиды): учебное пособие / В. М. Мирович, Е. Г. Привалова. – Иркутск: ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет МЗ РФ, 2018. – 70 с.
11. Птичкин, И. И. Пищевые полисахариды: структурные уровни и функциональность / И. И. Птичкин, Н. М. Птичкина. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2005. – 164 с.

12. Кочетков, Н. К. Химия биологически активных природных соединений / Н. К. Кочетков. – Москва: Химия, 1970. – 378 с.
13. Кудашкина, Н. В. Фитохимический анализ: учебное пособие / Н. В. Кудашкина, С. Р. Хасанова, С. А. Мещерякова. – Уфа: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2019. – 193 с.
14. Белковые изоляты из растительного сырья: обзор современного состояния и анализ перспектив развития технологии получения белковых изолятов из растительного сырья / Д. В. Компанцев, А. В. Попов, И. М. Привалов, Э. Ф. Степанова // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 1. – С. 58.
15. Пелевина, А. И. Зернобобовые культуры – решение проблемы белка / А. И. Пелевина // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. – 2017. – Т. 1, № 3. – С. 44–46.
16. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р. Г. Бутенко. – Москва: ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с.
17. Кулуев, Б. Р. Основы биотехнологии растений: учеб. пособие / Б. Р. Кулуев, Н. Н. Круглова, А. А. Зарипова, Р. Г. Фархутдинов. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. – 244 с.
18. Гамбург, К. З. Ауксины в культурах тканей и клеток растений / К. З. Гамбург, Н. И. Рекославская, С. Г. Швецов. – Новосибирск: Наука, 1990.
19. Цыренов, В. Ж. Основы биотехнологии: культивирование изолированных клеток и тканей растений: учеб.-метод. пособие / В. Ж. Цыренов. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. – 57 с.
20. Васильева, Н. Г. Биоразлагаемые полимеры / Н. Г. Васильева // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16, № 22. – С. 156–157.
21. Ермакова, Е. А. Применение инновационных решений в создании экологически чистых упаковочных материалов / Е. А. Ермакова // Сервис в России и за рубежом. – 2014. – № 2 (49). – С. 116–121.
22. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review / P. J. Perez Espitia, W. X. Du, R. de Jesús Avena-Bustillos et al. // Food Hydrocolloids. – 2014. – Vol. 35. – P. 287–296.
23. Савицкая, Т. А. Съедобные полимерные пленки и покрытия: история вопроса и современное состояние (обзор) / Т. А. Савицкая // Полимерные материалы и технологии. – 2016. – Т. 2, № 2. – С. 6–36.
24. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods / I. Ahmed, H. Lin, L. Zou et al. // Food Control. – 2017. – Vol. 82. – P. 163–178.
25. Brody, A. L. Packaging innovation-past, present, and future / A. L. Brody // Food Technology. – 2011. – Vol. 65. – P. 80–82.
26. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review / F. Garavand, M. Rouhi, S.H. Razavi et al. //

- International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 104. – P. 687–707.
27. Nur Fatin Nazurah, R. Physicochemical characterization of kappa-carrageenan (Eucheima cottoni) based films incorporated with various plant oils / R. Nur Fatin Nazurah, Z. A. Nur Hanani // Carbohydrate Polymers. – 2017. – Vol. 157. – P. 1479–1487.
  28. Preparation of antimicrobial agar/banana powder blend films reinforced with silver nanoparticles / A. Orsuwan, S. Shankar, L.F. Wang et al. // Food Hydrocolloids. – 2016. – Vol. 60. – P. 476–485.
  29. Mishra, R. K. Pectin based formulations for biomedical applications: a review / R. K. Mishra, A. K. Banthia, A. B. A. Majeed // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2012. – Vol. 5. – № 4. – P. 1–7.

Локальный электронный методический материал

Любовь Сергеевна Дышлюк

**ПРОМЫШЛЕННЫЕ И ИННОВАЦИОННЫЕ  
БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ИЗ СЫРЬЯ  
РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Редактор Е. Билко

Уч.-изд. л. 4,4. Печ. л. 3,8

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