

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Смоленская государственная сельскохозяйственная академия

Е.В. Иванова, О.И. Солнцева

**ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ**

**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
К ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ**

Смоленск 2023

УДК 631.147:573.6(075.8)

ББК 40.06:36 Я73

И - 21

Рецензенты: Кугелев И.М., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Смоленская сельскохозяйственная академия; Никитин А.Н., кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур»

Иванова Е.В., Солнцева О.И.

И - 21 Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции: учебное пособие к лабораторно-практическим занятиям / Е.В. Иванова, О.И. Солнцева. – Смоленск: ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, 2023. - 106 с.

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции; изучающих основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции. В учебно-методическом пособии освещены разделы: энзимология, микробная биотехнология, пищевая биотехнология, генная инженерия, в которых изложена основная информация о последних достижениях, характере развития и практическом использовании разработок ученых и практических работников.

Учебно-методическое пособие включает в себя лабораторные работы по энзимологии, микробной биотехнологии, пищевой биотехнологии.

Печатается по решению научно-методического совета ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА (протокол № 6 от 29 июня 2023 г).

УДК 631.147:573.6(075.8)

ББК 40.06:36 Я73

© Иванова Е.В., Солнцева О.И., 2023
© ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, 2023

Предисловие

Последнее десятилетие XX века и первое десятилетие XXI характеризуются выдающимися достижениями биотехнологии, которая является междисциплинарной областью знаний, базирующейся на микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии, биофизике, вирусологии, иммунологии, генетике, инженерных науках и электронике (рисунок 1).



Рисунок 1 - Связь биотехнологии с другими науками.

Развитие биотехнологии позволяет существенно интенсифицировать производство, повысить эффективность использования природных источников

энергии, создавать их новые виды, решать экологические проблемы. Возможности биотехнологии при международном сотрудничестве специалистов могут быть направлены на решение мировых кризисных проблем, связанных с восполнением дефицита белка и энергии, предотвращением опасных заболеваний, охраной окружающей среды.

Человек начал использовать биотехнологию много тысяч лет назад – варил пиво, пек хлеб, мариновал овощи, сквашивал молоко. В результате многолетних наблюдений были разработаны способы хранения и переработки продуктов путем ферментации (производство сыра, уксуса, соевого соуса), научились перерабатывать отходы. Причины внимания к биотехнологии, и возникновения ее как науки можно разделить на две группы.

1. Развитие и достижения в области молекулярных биологических наук таких как генетика, биохимия, биофизика, молекулярная биология, генная инженерия. Методы последней основаны на создании рекомбинантных ДНК, полученных вне живой клетки, путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке.

2. В связи с ростом населения планеты, урбанизацией, уменьшением площадей занятых сельским хозяйством возникла острая необходимость в новых технологиях, которые могли бы решить проблемы: нехватку продовольствия и энергетических ресурсов, здравоохранения, ветеринарии, и экологии.

До 70-х годов двадцатого столетия не существовало термина биотехнология, зато были такие как производственная микробиология, техническая биология, прикладная генетика и ряд других.

В 70-е годы биотехнологией стали называть науку о практическом использовании биологии в целом, а не отдельных ее ветвей.

Затем появилось значительное количество определений термина «биотехнология», причем каждый из них отражает ту или иную сферу деятельности этой новой и загадочной науки, приведем формулировки некоторых из них.

Биотехнология – это комплекс знаний о целенаправленном научно обоснованном использовании биологических процессов при производстве, переработке и использовании сырья.

Биотехнология – это управляемое получение полезных для народного хозяйства, а также медицины целевых продуктов с помощью биологических агентов, микроорганизмов, вирусов, клеток животных и растений, а также с помощью внеклеточных веществ и компонентов клеток.

Биотехнология – наука о закономерностях поведения биологических систем при управляемом получении целевых продуктов и решении народнохозяйственных задач.

Теоретической задачей биотехнологии является изучение и понимание закономерностей поведения биологических систем в специально созданных условиях, максимально способствующих проявлению генетических свойств или активности биологического объекта.

Одна из особенностей биотехнологии состоит в том, что она использует технологии производства продуктов на ранних этапах развития микробиологического синтеза.

Выявлены существенные потенциальные возможности для усовершенствования традиционных технологий и возможности расширения сфер приложения получаемых продуктов. Например, методом генетической инженерии созданы уникальные штаммы микроорганизмов для сыроварения.

Разработка биотехнологических процессов связана с большими капиталовложениями. Внедрение новейших биотехнологий особенно перспективно в тех случаях, когда продукт не может быть получен другими способами или может быть получен в недостаточных количествах, по более высокой цене. Исследования в этом направлении в основном сосредоточены на производстве фармакологических препаратов, диагностикумов.

Иммунная биотехнология, с помощью которой распознают и выделяют из смесей одиночные клетки, применяется непосредственно в медицине для диагностики и лечения. Используется в научных исследованиях, в фармакологической, пищевой и других отраслях промышленности, а также для получения препаратов, синтезируемых клетками защитной системы организма.

Большое будущее биотехнологии связано с протоинженерией — технологией изменения свойств природных белков на генетическом уровне. Таким образом, получают новые белки (например, новые стимуляторы роста растений, инсектициды, активные и устойчивые ферменты, высококачественные пищевые продукты, биосенсоры и биоэлементы, медицинские приборы).

Важную роль в указанном направлении играют расширение и усовершенствование существующих биотехнологических процессов, создание новых. Большие перспективы связаны с введением в растение комплекса генов, управляющих фиксацией азота.

Растущая область биотехнологии — биоэлектроника. Использование биосенсоров — это революция методов измерения и контроля в различных отраслях промышленности, медицине, научных исследованиях.

Внедрение биотехнологии в добывающую промышленность дает возможность перехода от тяжелой индустрии к высоким технологиям. Применение биотехнологии металлов перспективно для извлечения из руд платины и других драгоценных и стратегически важных металлов. Использование биотехнологических методов позволит увеличить процент извлечения нефти из скважин, удаления серы из угля, метана из шахт, что в свою очередь решает ряд экологических проблем.

Внедрение биотехнологии в практику изменяет соотношение в системе: человек — производство — природа, повышает производительность труда. Широкое использование биотехнологических процессов способствует сближению грани между промышленным и сельским производством, поскольку продукты питания, корма и другие сельскохозяйственные продукты вырабатывают в индустриальных условиях. Так, применение на фермах установки для переработки сельскохозяйственных отходов в биогаз, позволит удовлетворить собственные потребности в топливе; внедрить в производство промышленные методы получения компонентов кормов.

Развитие биотехнологии в огромной степени определяется исследованиями в области микробиологии, биохимии, энзимологии и генетики микроорганизмов,

а также наличием коллекций культур, надлежащим образом учтенных и постоянно изучаемых. Такие коллекции микроорганизмов находятся в Институте микробиологии, НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов, а также других научно-исследовательских учреждениях. Биотехнологические разработки базируются на глубоком знании таксомных микроорганизмов.

Развитие биотехнологии идет по пяти направлениям: микробная биотехнология, инженерная энзимология, генная инженерия, клеточная инженерия и пищевая биотехнология, которую, последнее время выделяют, как отдельную ветвь биотехнологии, но она объединяет в себе достижения всех остальных направлений в соответствии рисунком 2.

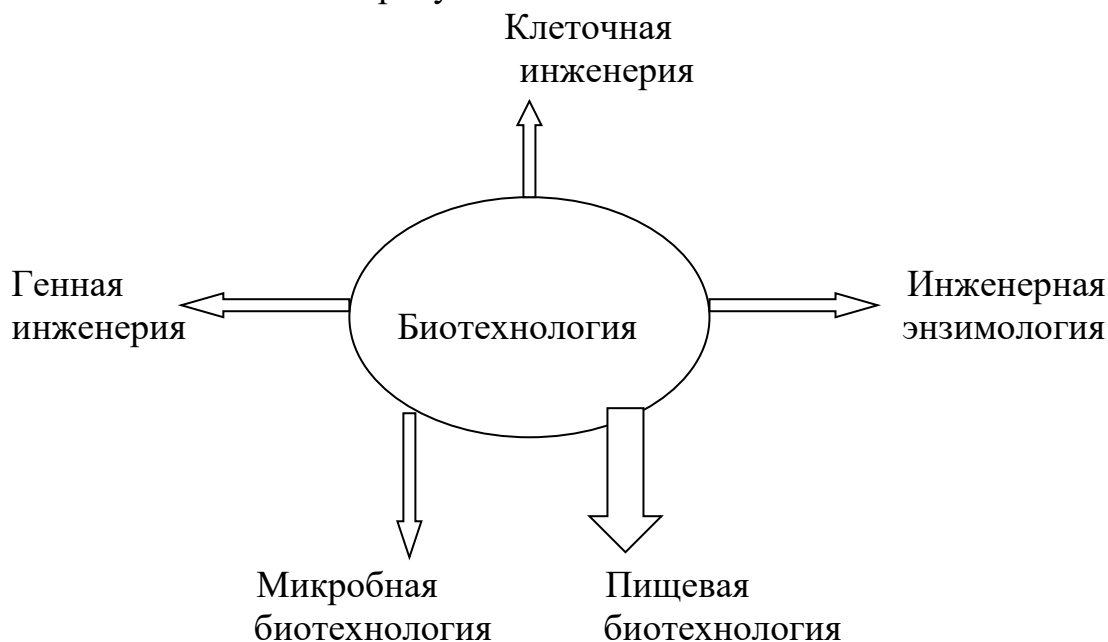


Рисунок 2 - Направления биотехнологии.

Микробная биотехнология изучает возможность использования в народном хозяйстве микроорганизмов, распространенных в природе.

Генная инженерия при помощи изоляции и изменения отдельных генов, модификаций молекул ДНК и переноса её из одного организма в другой, позволяет на основе рекомбинации генов направленно создавать организмы с заданными свойствами.

Клеточная инженерия изучает свойства полученных культивированием на средах отдельно выделенных из высших организмов клеток и микроорганизмов, полученных методом генной инженерии, занимается конструированием новых клеток и клеточных систем.

Инженерная энзимология призвана, опираясь на теоретические основы наук изучающих структуру, свойства, функции и механизм действия ферментов, создавать технологические процессы с использованием биологических катализаторов (ферментов).

Пищевая биотехнология занимается разработкой технологий производства пищевых продуктов с учетом химического, биологического, микробиоло-

гического состава пищи, физиологии человека, медико-биологических и гигиенических основ питания.

Каждая лабораторная работа рассчитана на 2 академических часа и выполняется группами студентов по 3-4 человека. Выбор варианта работы и контрольное задание определяются преподавателем. Перед выполнением лабораторной работы студент должен повторить теоретическую часть курса по изучаемой теме, используя лекционный материал и методическое пособие по изучаемой дисциплине, разобраться в сущности метода и методике определения показателя.

1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

К работе в лаборатории допускаются студент после его ознакомления с правилами техники безопасности, в защитной одежде – халате.

1.1 Вводный инструктаж

Студенты несут личную ответственность за несоблюдение правил и требований по технике безопасности и правил противопожарной безопасности. Особое внимание при работе в лаборатории они должны обращать на выполнение следующих требований и рекомендаций:

1. При выполнении лабораторных работ следует строго руководствоваться методиками по проведению исследований. Любое отклонение от них возможно только по разрешению преподавателя.

2. К выполнению лабораторных работ студенты допускаются при наличии защитной одежды – халата.

3. Работая с химическими реактивами, необходимо избегать попадания их на руки, нельзя трогать лицо и глаза руками. После работы следует тщательно мыть руки. Запрещается принимать пищу в лаборатории.

4. Запрещается пробовать химические вещества на вкус и запах.

5. Для работы использовать только реактивы, находящиеся в химической посуде, имеющей соответствующие этикетки с названием реактива.

6. Измерение объемов кислот и щелочей, а также других едких и ядовитых жидкостей разрешается только с помощью мерного цилиндра, автоматической пипетки или пипетки с резиновой грушей.

7. Запрещается наклоняться над сосудом, в который наливается жидкость или в котором она нагревается или кипит, так как брызги жидкости могут попасть в лицо и в глаза; запрещается нагревать жидкости в герметично закрытой посуде.

8. Все работы, связанные с выделением летучих веществ, выпариванием и кипячением растворов, содержащих кислоты, аммиак, работы с диэтиловым эфиром и другими растворителями, работы по сжиганию исследуемых веществ разрешается проводить только в вытяжном шкафу при включенной тяге и опущенном защитном экране.

9. При проведении работ в вытяжном шкафу голова и корпус тела должны оставаться вне шкафа; наблюдение за работой необходимо проводить через стекло опущенной створки.

10. Запрещается работать с легковоспламеняющимися веществами (диэтиловый эфир, ацетон, спирт и другие растворители) вблизи открытых электронагревательных приборах.

11. При извлечении бюкс из сушильного шкафа и переносе их необходимо пользоваться специальными щипцами; ставить для охлаждения только на огнестойкую подставку.

12. При перемещении колб и химических стаканов с горячими жидкостями следует соблюдать повышенную осторожность.

13. В основном следует работать стоя; только работы, не связанные с опасностью воспламенения, разбрызгивания жидкостей, взрыва, можно выполнять сидя. Работать в лаборатории одному запрещается.

14. При работе с электроприборами следует строго соблюдать все правила, приведенные в описании прибора. Переносить или ремонтировать оборудование, находящееся под напряжением, запрещается.

15. Категорически запрещается оставлять включенные действующие приборы без наблюдения.

16. При выполнении работ повышенной опасности (возможность самовозгорания, взрыва, разбрызгивания горячих и агрессивных жидкостей) необходимо надевать защитный козырек из органического стекла или предохранительные очки или устанавливать защитный экран.

17. При работе со стеклянной посудой, при сборке и разборке приборов и их деталей из стекла необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

- стеклянные трубки вставлять в пробки или соединять с гибкими (резиновыми) трубками можно, только смочив их водой, глицерином или вазелиновым маслом. При этом сосуд должен быть обернут полотенцем;
- при закрывании пробкой сосуд необходимо держать за верхнюю часть горла как можно ближе к пробке. При этом сосуд должен быть обернут полотенцем;
- при перемешивании стеклянной палочкой нужно избегать ударов по стенкам посуды;
- нельзя нагревать химическую посуду на огне без асбестовой сетки;
- толстостенная химическая посуда не выдерживает нагревания, поэтому в нее нельзя наливать горячую жидкость без предварительного ополаскивания ею стенок и дна сосуда.

18. Остатки растворителей, концентрированных кислот и щелочей, а также других едких жидкостей следует сливать в специальную емкость и затем только после специальной обработки (нейтрализации, отгонки, обезвреживания) в канализацию.

19. В случае воспламенения горючих жидкостей или других веществ, следует выключить электронагревательные приборы, удалить от огня сосуды с огнеопасными жидкостями и принять меры по ликвидации пожара.

20. В лаборатории необходимо соблюдать и поддерживать порядок и чистоту. По окончании работы следует выключить электроприборы, обесточить электропитки на лабораторных столах, тщательно промыть использованную посуду, убрать рабочее место, вымыть руки с мылом и закрыть водопроводные краны.

1.2 Правила обращения с концентрированными веществами

Разлитые кислоты и щелочи необходимо немедленно нейтрализовать, а затем тщательно смыть водой. Для нейтрализации щелочей применяются раство-

ры борной или 8%-й уксусной кислот, для нейтрализации кислот – 5% раствор пищевой соды.

Хромовую смесь, применяемую для мытья посуды, и другие крепкие растворы нельзя всасывать пипеткой и выливать в раковину.

1.3 Первая помощь при несчастных случаях

Первую помощь пострадавшему при несчастном случае до прибытия врача должны оказать присутствующие, включая студентов. Часто здоровье, а иногда и жизнь пострадавшего зависит от того, насколько быстро и правильно была оказана ему первая помощь. Поэтому каждый студент обязан знать как практические приемы первой помощи, так и меры снижения опасности или тяжести травмы в момент несчастного случая.

Наиболее частыми при работе в лаборатории являются термические и химические ожоги кожи рук, а также порезы. При ожогах необходимо соблюдать следующие правила:

1. При попадании кислот и щелочей на кожу, а также при небольшом ожоге следует немедленно промыть пораженный участок большим количеством водопроводной воды в течение 10-30 минут.

2. При термических ожогах пораженное место необходимо после обработки водой промыть раствором перманганата калия или этиловым спиртом и смазать мазью от ожогов.

3. При химических ожогах кислотой обожженное место необходимо после обработки водой промыть раствором 5%-ного бикарбоната натрия. При ожоге кожи едкой щелочью обожженное место необходимо после обработки водой промыть раствором 5%-й уксусной кислоты.

4. При обработке пораженного места следует использовать ватный тампон, не допуская растекания жидкости по коже.

5. При значительных по площади кожи ожогах или попадании кислот и щелочей в глаза необходимо сразу же оказать первую помощь и вызвать скорую медицинскую помощь.

6. В случае пореза стеклом рану следует очистить от осколков, а затем поверхность вокруг раны обработать раствором йода или пероксида водорода и завязать бинтом.

7. Во всех случаях отравления химикатами следует немедленно вызвать врача или отправить пострадавшего в медпункт. В исключительных случаях при отравлении щелочами пострадавшему следует дать выпить молоко, 2%-й раствор уксусной или лимонной кислот; при отравлении кислотами – воду со льдом, 1%-й раствор соды.

2. ЭНЗИМОЛОГИЯ

Ферменты – энзимы – особые белки являющиеся биологическими катализаторами, высокоспецифичными по отношению к своим субстратам, ускоряющими строго определенные химические реакции без образования побочных продуктов. В организме ферменты действуют в строго определенной последовательности, катализируя сотни многостадийных реакций, в ходе которых расщепляются молекулы питательных веществ, запасается и преобразуется химическая энергия, из простых молекул-предшественников строятся макромолекулы, входящие в состав клеток.

В настоящее время известно и изучено почти 2000 различных ферментов. В сырье под действием собственных ферментов протекает процесс созревания, который традиционно используют при обработки сырья и продуктов животного происхождения с целью получения мясных, кисломолочных продуктов, сыров, рыбопродуктов.

При обработке пищевого сырья используют эндогенные и экзогенные биокаталитические процессы. Эндогенные процессы протекают в основном за счет тканевых ферментов (процессы созревания). В этом случае пищевая технология складывается из обеспечения таких режимов и условий обработки сырья и производства готового продукта, которые бы обеспечивали целенаправленный распад биополимерных систем под действием энзимов с образованием химических предшественников вкуса и аромата, формирование необходимых реологических и функционально-технологических свойств пищевых систем, что обеспечивало бы желаемые органолептические показатели, высокий уровень качества, пищевой и биологической ценности готового продукта.

Экзогенные процессы обеспечиваются обработкой сырья препаратами разработанными на основе предварительно выделенных из различных источников ферментов. Экзогенные ферменты используются для интенсификации технологического процесса производства, особенно в молочной и мясной промышленности.

Например, свежеприготовленная сырная масса безвкусная с резинистой консистенцией. В процессе созревания сырной массы под действием ферментов, в основном протеиназ, происходят изменения ее составных частей, в результате чего она приобретает свойственные данному сыру консистенцию, рисунок, вкус, аромат. Под действием эндогенной системы ферментов процесс созревания сырной массы протекает медленно, качественные характеристики готового продукта не стабильны. Применение экзогенной системы ферментов, включающей препарат сычужного фермента (ренина) и клеток бактерий и грибов, продуцирующих протеолитические ферменты, интенсифицирует процесс постоянного распада белковых систем с образованием специфических продуктов, набор которых регулируется условиями реакции и видовыми особенностями заквасок, благодаря чему, создается вкус, аромат, консистенция и другие специфические свойства данного вида сыра.

В результате эндогенных ферментных процессов происходит разрешение мышечного окоченения и накопление химических предшественников вкуса и

аромата в мясе. В процессе автолиза, под воздействием кислой реакции среды клетки активируются протеолитические ферменты, катепсины, которые освобождаются из лизосом во втором периоде автолиза. Катепсины, являясь типичными протеиназами, вызывают деструкцию высокомолекулярных белков. Различают пять основных типов катепсинов – А,В,С,Д,Е. Каждый из них оказывает специфическое действие на белки. Катепсин А способен гидролизовать синтетический субстрат карбобензоксипептид – L – глютамин – L- тирозин, катепсин В содержит папаинтиоловую протеиназу, катепсин С является сульфгидрильной протеиназой, а по субстратной специфичности свободной аминопептидазой, которая участвует не только в пептидном гидролизе, но и может действовать как активная трансфераза, катепсин Д активно гидролизует гемоглобин, сходен с пепсином. То есть, катепсины действуя на разные субстратные фрагменты, оказывают существенное влияние на структуру белковых компонентов. Созревание мяса под действием эндогенных систем из-за недостаточной эффективности развивающихся биологических реакций является длительным процессом и требует использования больших производственных площадей. Для ускорения протекания созревания в мясной промышленности широко используются протеолитические ферментные препараты. Они должны обладать высоким температурным оптимумом действия, кислой и нейтральной областью рН эффективного гидролиза, иметь сходность действия с катепсинами, коллагеназой и эластазой т.е. обеспечивать гидролиз миозина и особенно коллагена и эластина, быть безвредными для здоровья человека.

Процессы созревания мяса протекают в 3-5 раз интенсивнее при искусственном внесении в сырье препаратов протеиназ специфически действующих на такие белки мяса, как миозин, коллаген и эластин. Интенсивность и глубина превращений белковых структур зависит от дозировки препаратов, физико-химических условий, способа и продолжительности обработки. Ферментные препараты, в состав которых входит панкреатин, трипсин, химотрипсин, пепсин вырабатывают из ферментно-эндокринного сырья. Из них только панкреатин обладает сравнительно высокой коллагеназной и эластазной активностью. В целом ферменты животного происхождения имеют весьма ограниченные сырьевые источники и их применение малоэффективно ввиду низкого температурного оптимума и неспособности, кроме панкреатина, к гидролизу коллагена и эластина. Наиболее эффективно применение в производстве мясной продукции ферментов растительного (папаин, фицин, бромелаин и др.) и микробного происхождения. Применение протеолитических ферментов с коллагеназным эффектом позволяет повысить пищевую и биологическую ценность продуктов за счет воздействия их на структуру непереваримых соединительно-тканых белков, что повышает их усвояемость в организме человека. Предварительная обработка говядины II сорта ферментами, позволяет использовать это сырье для выработки оригинальных цельномышечных мясных изделий. Ферментная обработка свиной шкурки применяют вместо ее варки при получении белково-жировой эмульсии. Морфологически однородную структуру крови убойных животных используемой на пищевые цели, получают под действием ферментных препаратов обеспечивающих гидролиз оболочек форменных элементов

крови. Гидролиз гемоглобина под действием ферментных препаратов используют при обесцвечивании крови.

2.1 Место ферментативной биотехнологии в пищевой промышленности

Одно из ведущих мест в современной биотехнологии занимает производство биологически активных веществ - ферментных препаратов, синтезируемых в процессе жизнедеятельности животными, растительными и/или микробиальными клетками.

Использование ферментов превратилось в важнейший промышленный принцип совершенствования пищевой технологии. Существенный вклад в это внесли достижения микробиологии и биохимии.

Биохимические процессы, протекающие при хранении сырья и при производстве пищевых продуктов, связаны с действием естественных, собственных ферментов пищевого сырья, а также ферментов, вносимых в ходе технологического процесса в виде ферментных препаратов. Прежде всего, это ферменты, продуцируемые различными микроорганизмами, грибами и плесенями. В качестве питательных сред для получения ферментных препаратов используют проросшее зерно, ткани животных или тропические растения.

Еще на заре цивилизации человек сталкивался с различными ферментативными процессами и использовал их в своей практической деятельности. Спиртовое и молочнокислое брожение, применение сычуга при приготовлении сыров, использование солода и плесневых грибов для осахаривания крахмалистого сырья, применение заквасок при изготовлении хлеба — все эти ферментативные процессы хорошо известны с незапамятных времен.

В настоящее время многие отрасли промышленности — хлебопечение, виноделие, пивоварение, производство спирта, сыроделие, производство органических кислот, чая, аминокислот, витаминов, антибиотиков — основаны на использовании различных ферментативных процессов. Препараты ферментов также находят все более широкое применение в медицине и сельском хозяйстве. В этой связи возникла и получила развитие новая отрасль промышленности — производство ферментных препаратов.

Общие аспекты применения ферментов в пищевой промышленности, а также вопросы, связанные с производством промышленных ферментов, нашли широкое отражение в специальной учебной и научной литературе. Однако необходимо обратить особое внимание на то, что работа с ферментами, их использование требуют элементарной грамотности в вопросах ферментативной кинетики и способах регуляции ферментативной активности.

Необходимо всегда учитывать наличие в сырье собственных эндогенных ферментов, которые в процессе приготовления пищевых продуктов могут оказывать различное действие (как положительное, так и отрицательное) на протекание технологических процессов и качество готовой продукции.

Известно, например, что в молоке, полученном при нормальных условиях от здорового животного, содержится около 100 ферментов различного происхождения. Среди них учеными выделено и идентифицировано более 20 натив-

ных (истинных) ферментов, относящихся к основным шести классам — оксидоредуктаз, трансфераз, гидролаз, лиаз, изомераз и лигаз.

Одни ферменты (лактозосинтаза, щелочная фосфатаза, ксантиноксидаза, лизоцим и др.) синтезируются непосредственно в секреторных клетках молочной железы, другие - (каталаза, плазмин, липопротеидлипаза, рибонуклеаза, альдолаза и др.) поступают в молоко из крови животного.

Основная часть нативных ферментов молока всех млекопитающих являются нормальными компонентами секреторных клеток, и участвуют в клеточном метаболизме и синтезе составных частей молока, а переходят в молоко при повреждении клеток во время процесса секреции. Скорее всего, некоторые гидролитические ферменты (протеиназы, липазы и др.) специально секретируются клетками молочной железы для оказания помощи новорожденному в усвоении питательных веществ молока, из-за несовершенной пищеварительной системы детенышей.

Кроме нативных ферментов в молоке присутствуют многочисленные внеклеточные и внутриклеточные ферменты, продуцируемые микрофлорой молока, бактериальных заквасок, при их внесении, а также посторонними микроорганизмами. Некоторые ферментные препараты (сычужный фермент и его заменители, пепсин, β -галактозидаза и др.) специально вносят в молоко при изготовлении молочных продуктов для придания им определенных свойств.

Ферменты, встречающиеся в молоке и молочных продуктах, имеют большое практическое значение. Так, на действии ферментов классов гидролаз, оксидоредуктаз и других основано производство кисломолочных продуктов и сыров. Многие липолитические, протеолитические и другие ферменты вызывают глубокие изменения составных частей молока во время выработки и хранения молочных продуктов, что играет положительную роль, например, при созревании сыров, но и может привести к снижению пищевой ценности продуктов и возникновению их пороков. Кроме того, по активности некоторых нативных и бактериальных ферментов можно судить о санитарно-гигиеническом состоянии сырого молока или эффективности его термической обработки, а точнее пастеризации.

Лабораторная работа № 1

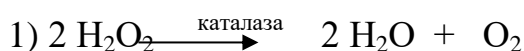
Определение активности каталазы и редуктазы для контроля качества сырого молока

Цель работы. Освоить биотехнологические методы оценки качества молока-сырья.

Задачи. Определить активность каталазы и редуктазы в молоке - сырье, определить класс исследуемых образцов натурального молока по бактериальной обсемененности.

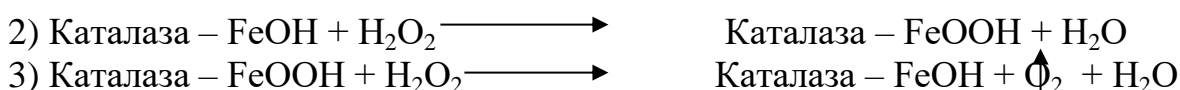
Определение активности каталазы

Каталаза (Н.Ф. 1.11.1.6). Фермент относится к классу оксидоредуктаз. Катализирует разложение перекиси водорода (пероксида водорода) на воду и кислород, т.е при этом одновременно происходит окисление одной молекулы перекиси водорода до кислорода и восстановление другой молекулы до молекулы воды:



Каталаза - двухкомпонентный фермент, димер, относится к группе гомопротеиновых ферментов (в активном центре имеет протогематин). Содержит 0,009% железа в виде геминной группировки или 4 атома на 1 молекулу фермента. Молекулярная масса ферментов, выделенных из различных объектов (дрожжей, растительных и животных тканей, микроорганизмов), лежит в пределах от 225 000 до 250 000 Да. Каталаза из различных объектов имеет существенные различия в оптимуме действия рН (от 2 до 9), в термо- и рН-стабильности. Фермент ингибируется цианидом (обратимо), фенолами (обратимо лишь в слабой форме), щелочью и мочевиной (необратимо). Молекулярная масса фермента в молоке составляет 225 000-230 000, оптимум действия находится при рН 7,0-8,0, при температуре 20-40°C (изоэлектрическая точка при рН 5,4-5,7). Каталаза работает при температуре от 0°C, а нагревание до температуры 75-80°C вызывает ее разрушение.

Возможный механизм действия каталазы описывается уравнениями:



Активность каталазы выражают в стандартных единицах (Е) и международных единицах (нкат), а также через объем кислорода, выделившегося из определенного объема молока при определенных условиях.

Зависимость между отдельными единицами активности каталазы:
 $1\text{Е} = 16,67 \text{ нкат} = 6,25 \text{ см}^3 \text{ кислорода}$.

Функцией каталазы в живом организме является защита клетки от губительного действия перекиси водорода. Хорошим источником для получения промышленных препаратов каталазы являются культуры микроорганизмов и печень крупного рогатого скота. Каталаза находит свое применение в пищевой промышленности, в основном молочной. Каталаза переходит в молоко из тканевой молочной железы, а также вырабатывается бактериями. Содержание нативной (природной) и бактериальной каталазы колеблется. В свежем молоке с низким содержанием микрофлоры и полученном от здоровых животных, каталазы содержится мало. В молозиве и молоке, полученном от больных животных (мастит и др. заболевания), или в молоке с высокой бактериальной обсемененностью ее содержание увеличено. Поэтому определение активности каталазы используют для контроля аномального молока или выявления его обсемененности соматическими клетками (клетки эпителия, крови, гноя), психотрофной и гнилостной микрофлорой (она может составлять выше 16,0 Е см. таблицу 1.

Согласно требованиям ГОСТа, молоко, полученное в первые семь дней лактации (молозиво) и последние десять дней лактации (стародойное) называют аномальным и оно не подлежит приемке на молокоперерабатывающие предприятия.

Аномальным молоком считают также молоко, полученное от коров, больных маститом, или с другими нарушениями состояния животного. Аномальное молоко отличается от нормального молока по химическому составу, физико-химическим свойствам и содержит большое количество соматических клеток.

Таблица 1 - Активность каталазы в молоке

Название образца	Активность каталазы, Е
Свежевыдоенное молоко от здоровых животных	4,0-16,0
Молозиво (молоко, полученное в первую неделю лактации)	50,0-94,0
Стародойное молоко (молоко, полученное в последние 10 дней лактации)	37,0-50,0
Маститное молоко (молоко, полученное от животного больного маститом)	Более 62,0

Каталазная проба основана на определении количества разложившегося перекиси водорода, добавленного к молоку. Также каталазу совместно с глюкозооксидазой применяют для удаления кислорода и следов глюкозы.

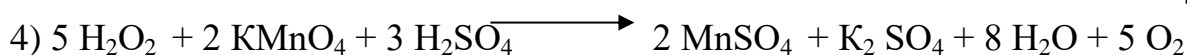
Для определения активности каталазы используют полярографический, манометрический и перманганатометрический методы. Последний метод наиболее точен.

Приборы. Колбы конические вместимостью 100 и 200 см³; пипетки вместимостью 2, 20, 25 см³; бюретки вместимостью 10 и 50 см³ с ценой деления 0,1 см³; цилиндр мерный вместимостью 100 см³, термометр ртутный с диапазоном измерений от 0 до 55 °С; электроплитка; баня водяная; термостат; секундомер.

Материалы и реактивы. Молоко сырое; раствор перекиси водорода с массовой долей 0,3%; раствор перманганата калия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм³; раствор серной кислоты с массовой долей 10%.

Методика определения. Сущность метода состоит в количественном определении перекиси водорода, разложенной каталазой, содержащейся в 1 см³ молока, за 1 минуту при 25 °С.

Неразложившаяся перекись водорода оттитровывается раствором перманганата калия в кислой среде:



Количество разложившейся перекиси водорода находят по разнице между контрольным и опытным титрованием.

Ход работы. Перед началом исследований часть анализируемого молока кипятят для инактивации каталазы.

В две конические колбы вместимостью 200 см³ пипетками вносят в первую – 2 см³ сырого молока (опытная проба), во вторую - 2 см³ кипяченого молока (контрольная проба). Молоко должно быть температурой 20±1 °С. В обе колбы добавляют по 98 см³ дистиллированной воды, температура которой 20±1 °С. Содержимое колб перемешивают и нагревают на водяной бане до температуры 25±1 °С. Затем в обе колбы вносят по 25 см³ 0,3%-ного раствора перекиси водорода, колбы закрывают пробками и все тщательно перемешивают. Колбы помещают в термостат на 30 минут при температуре 25±1 °С. В тетради фиксируют время начала опыта.

Через 30 минут в обе колбы вносят по 5 см³ 10%-ного раствора серной кислоты и титруют из бюретки раствором перманганата калия (С_э=0,1 моль/дм³) до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 минуты. Исчезновение окрашивания в более поздний срок связано с окислением органических частей молока.

Активность каталазы в стандартных единицах рассчитывают по формуле:

$$5) A_E = (V_k - V_o) \cdot 1,7/m \cdot t \cdot 0,034 (E) \quad ,$$

где V_к – объем перманганата калия, израсходованного на титрование контрольной пробы, см³;

V_о – объем перманганата калия, израсходованного на титрование опытной пробы, см³;

1,7 – масса перекиси водорода, соответствующей 1 см³ раствора перманганата калия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм³, мг;

m – объем молока, см³, (m = 2 см³);

t – продолжительность выдержки молока с раствором перекиси водорода, мин. (t = 30 мин);

0,034 – масса 1 мкМ перекиси водорода, мг.

После подстановки известных величин формула принимает вид:

$$6) A_E = (V_k - V_o) \cdot 0,83 (E) \quad .$$

Данная методика измерения активности каталазы рекомендуется для исследования сырого молока с активностью каталазы не выше 20 Е. При исследо-

вании аномального молока следует брать для анализа не все разведенное молоко (100см^3), а 20 см^3 . Тогда расчетная формула будет выглядеть:

$$7) A_E = (V_K - V_O) \cdot 4,15 (E) \quad .$$

Приготовление реактивов:

Раствор перекиси водорода с массовой долей 0,3%

Раствор H_2O_2 с требуемой массовой долей готовят из его концентрированного раствора.

Сначала определяют концентрацию имеющегося раствора перекиси водорода. Для этого в мерную колбу вместимостью 250 см^3 вносят $3,5 \pm 0,5$ г концентрированного раствора перекиси водорода, содержимое колбы доводят до метки прокипяченной и охлажденной до температуры 20 ± 1 °С дистиллированной водой, все тщательно перемешивают.

Затем берут 2 конические колбы вместимостью 250 см^3 , в одну из них пипеткой вносят 10 см^3 приготовленного раствора перекиси водорода (опытная проба), в другую 10 см^3 дистиллированной воды (контрольная проба), в обе колбы добавляют по 50 см^3 дистиллированной воды и по 10 см^3 разбавленной (1:4) серной кислоты. Содержимое колб титруют из бюретки раствором перманганата калия с эквивалентной концентрацией $0,1$ моль/ дм^3 до розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Массовую долю перекиси водорода (w) вычисляют по формуле:

$$8) w = \frac{(V - V_1) \cdot 0,0017 \cdot T \cdot 100}{m} \quad (\%),$$

где V_1 – объем раствора перманганата калия, пошедшего на титрование в контрольной пробе, см^3 ;

V_2 – объем раствора перманганата калия, пошедшего на титрование в опытной пробе, см^3 ;

$0,0017$ – масса перекиси водорода, соответствующая 1 см^3 раствора перманганата калия с эквивалентной концентрацией $0,1$ моль/ дм^3 , г;

T – титр раствора перманганата калия;

M – масса перекиси водорода, соответствующая 10 см^3 его раствора, взятого на титрование, г ($m = 0,14$ г).

Объем концентрированного раствора перекиси водорода (V), необходимого для приготовления 100 см^3 раствора с массовой долей 0,3%, рассчитывают по формуле:

$$9) V = \frac{100 \cdot 0,3}{w} \quad (\text{см}^3)$$

где w – массовая доля перекиси водорода в концентрированном растворе, %;

$0,3$ – массовая доля перекиси водорода, необходимая для приготовления 100 см^3 рабочего раствора, %;

100 – объем концентрированного раствора, содержащего w (%) перекиси водорода, см^3 .

Необходимый объем дистиллированной воды (V_1) для получения 100 см^3 раствора H_2O_2 с массовой долей 0,3% рассчитывают по формуле:

$$10) V_1 = 100 - V \quad (\text{см}^3) \quad .$$

Раствор перекиси водорода быстро разлагается, поэтому его готовят в небольшом количестве и хранят в склянке темного стекла в при температуре не более 15 °С в течение 2-х суток.

Раствор перманганата калия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм³

В колбу вместимостью 2000 см³ вносят 3,2±0,1 г химически чистого перманганата калия и 1000 см³ дистиллированной воды. Содержимое колбы кипятят в течение 1 ч, охлаждают до 19±1°С и оставляют при этой температуре на 10-15 дней для полного осаждения кристаллов. Затем раствор осторожно сливают с выделившегося бурого осадка MnO₂ и фильтруют через пористый стеклянный фильтр №3 или асбестовый фильтр в чистую темную склянку с притертой пробкой. Готовый раствор перманганата калия хранят в темном месте, не допуская контакта с резиновыми пробками.

Титр раствора KMnO₄ устанавливают по щавелевой кислоте или перекристаллизованному оксалату натрия. При титровании пользуются бюреткой со стеклянным краном, который слегка смазывают H₂SO₄.

Для перекристаллизации оксалата натрия в коническую колбу вместимостью 300-400 см³ вносят 6,0±0,1 г C₂O₄Na₂ и 200 см³ дистиллированной воды с температурой 50-60 °С, слегка подщелачивают 1н раствором NaOH для ускорения выпадения осадка и дают отстояться в течение нескольких часов. Нерастворимые вещества осаждаются. Раствор фильтруют через бумажный фильтр, после чего выпаривают на кипящей водяной бане до 1/3 первоначального объема. Выпавшие кристаллы оксалата натрия отфильтровывают, растирают в ступке, промывают дистиллированной водой комнатной температуры и высушивают при 240-250°С. Безводный оксалат натрия хранят в плотно закрытой банке.

В коническую колбу вместимостью 250-300 см³ вносят 0,2-0,25 г щавелевой кислоты или оксалата натрия и 100 см³ дистиллированной воды с температурой 80-90°С, содержимое колбы хорошо перемешивают до растворения реактива и охлаждают до комнатной температуры. Затем в колбу прибавляют 15 см³ раствора концентрированной серной кислоты, разбавленной дистиллированной водой в соотношении 1:1. Раствор нагревают до 80±1°С и медленно титруют из бюретки со стеклянным краном раствором KMnO₄ при непрерывном сильном перемешивании до появления слабо-розового окрашивания. Титрование ведут по каплям, не добавляя следующей, пока не обесцветится предыдущая. Первые капли перманганата калия обесцвечиваются медленно. К концу титрования температура раствора в колбе не должна быть ниже 60±1°С.

Титр (Т) раствора перманганата калия вычисляют по формулам:

для оксалата натрия:

$$11) T = g / V \cdot 0,0067 \quad ,$$

для щавелевой кислоты:

$$12) T = g_1 / V_1 \cdot 0,0063 \quad ,$$

где – навеска, соответственно, оксалата натрия и щавелевой кислоты, г

V и V₁ – объем раствора перманганата калия, израсходованного на титрование растворов, соответственно оксалата натрия и щавелевой кислоты, см³.

Раствор серной кислоты с массовой долей 10%

В коническую колбу вместимостью 150-200 см³ вносят 90 см³ дистиллированной воды с температурой 20±1 °С и 10 г концентрированной серной кислоты. Определяют плотность имеющейся кислоты ареометром при температуре 20±1 °С и по таблице (приложение 1) находят соответствующую массовую долю ее в 100 г раствора, по формуле представленной ниже вычисляют необходимый объем серной кислоты, содержащей 10 г вещества.

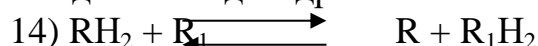
$$13) V = m / \rho ,$$

где m – расчетная по пропорции масса кислоты, г;
 ρ – плотность кислоты при 20 °С, г/см³.

Результаты исследований внести в таблицу 4:

Определение редуктазной активности

Редуктаза – дегидрогеназа относится к классу оксидоредуктаз. Дегидрогеназы – двухкомпонентные ферменты, в качестве кофермента имеют НАД (никотинамидадениндинуклеотид) или НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). Общий механизм действия дегидрогеназ описывается уравнением:

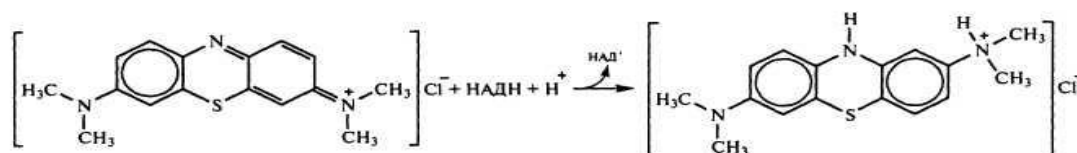


За международную единицу активности ферментов принят катал (кат). 1 кат – это такое количество фермента, которое в определенных условиях (температура, pH, концентрация субстрата) катализирует превращение субстрата со скоростью 1 моль в 1 с [1 нкат (нанокатал) = 1·10⁻⁹ кат].

Нативные дегидрогеназы переходят в молоко из молочной железы и их активность невелика. При развитии в молоке микроорганизмов накапливаются микробные дегидрогеназы. По количеству микробных дегидрогеназ косвенно судят о бактериальной обсемененности молока (ГОСТ 9225-84. «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа»).

Активность редуктазы и бактериальную обсемененность молока определяют по продолжительности восстановления (обесцвечивания) добавленного к молоку метиленового голубого или резазурина.

Реакция обесцвечивания метиленового голубого представлена уравнением:



15) Метиленовый голубой

Бесцветная лейкоформа

Резазурин (краситель голубого цвета, получаемый из резорцина) при восстановлении под действием редуктаз переходит сначала в резорурфин – краситель красного цвета, затем в бесцветный дигидрорезорурфин:

Молоко, относящееся к III классу по бактериальной обсемененности, считается несортным.

Б. Метод с резазурином

Методика определения. Метод основан на восстановлении резазурина окислительно-восстановительными ферментами, выделяемыми в молоко микроорганизмами. По продолжительности изменения окраски резазурина оценивают бактериальную обсемененность сырого молока.

Приборы. Редуктазник; штатив с пробирками; пипетки градуированные вместимостью 1; 10 см³.

Материалы и реактивы. Молоко сырое; рабочий раствор резазурина.

Ход работы. В пробирки вместимостью 15 см³ вносят по 1 см³ рабочего раствора резазурина и по 10 см³ исследуемого молока, закрывают резиновыми пробками и смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирок. Пробирки помещают в редуктазник с температурой воды 37±1 °С.

Вода в редуктазнике после погружения пробирок с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Пробирки с молоком и резазурином на протяжении анализа должны быть защищены от света прямых солнечных лучей.

Время погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа. Фиксируют его в тетради. Показания снимают через 20 мин и 1 час. После снятия показаний через 20 мин пробирки с обесцвеченным молоком удаляют из редуктазника. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают. По истечении 1 часа оставшиеся пробирки вынимают из редуктазника, осторожно переворачивают.

В зависимости от продолжительности обесцвечивания или изменения цвета молоко относят к одному из четырех классов, указанных в таблице 3.

Таблица – 3 Оценка качества молока в зависимости от продолжительности обесцвечивания резазурина

Класс молока	Время обесцвечивания или изменения окраски, ч	Ориентировочное количество бактерий в 1 см ³ молока, КОЕ	Окраска молока
Высший	1,5	До 300 тыс.	От серо-сиреневой до сиреневой со слабым серым оттенком
I	1	От 300 тыс. до 500 тыс.	То же
II	1	От 500 тыс. до 4 млн.	Сиреневая с розовым оттенком или ярко-розовая
III	1	От 4 млн. до 20 млн.	Бледно-розовая или белая

Молоко, относящееся к III классу по бактериальной обсемененности, считается несортным.

На предприятиях молочной промышленности предпочтение отдается методу определения редуктазы с резазурином, так как продолжительность обесцвечивания этого индикатора по времени меньше, чем метиленового голубого. Но этот метод имеет свой недостаток: резазурин довольно чувствителен к действию света. Прямое воздействие лучей солнечного света может привести к изменению окраски, а, следовательно, к недостоверности результатов анализа.

Приготовление реактивов:

Раствор метиленового голубого ($C_{16}H_{18}N_3SCL \cdot 3H_2O$) для пробы на редуктазу

В коническую колбу вместимостью 50 см³ отвешивают 4±0,1 г метиленового голубого, вносят 10 см³ 95%-ного этанола и тщательно перемешивают. Метиленовый голубой должен частично остаться в нерастворенном состоянии. Раствор оставляют в покое не менее двух часов при температуре 18-20 °С, после чего его фильтруют через бумажный фильтр в другую коническую колбу вместимостью 50 см³.

Для приготовления рабочего раствора в коническую колбу вместимостью 250-300 см³ пипеткой вносят 5 см³ отфильтрованного раствора и 195 см³ дистиллированной воды температурой 20±1 °С. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Раствор хранят в хорошо закрытой склянке из темного стекла.

Раствор резазурина с массовой долей резазурина в рабочем растворе 0,014%

Вначале готовят основной раствор резазурин-натриевой соли. Для этого в мерную колбу вместимостью 200 см³ вносят 0,10±0,01 г резазурин-натриевой соли и доводят до метки прокипяченной и охлажденной до 25±2 °С дистиллированной водой. Смесь тщательно перемешивают. Срок хранения основного раствора не более 30 суток при температуре 8-10 °С.

Для приготовления рабочего раствора резазурина основной раствор разбавляют прокипяченной и охлажденной до (25±2)°С дистиллированной водой в соотношении 1,0:2,5 (например, к 10 см³ основного раствора прибавляют 25 см³ воды).

Срок хранения рабочего раствора резазурина не более 3 суток при температуре 0-5 °С.

Основной и рабочий растворы хранят в склянках из темного стекла.

Результаты исследований внести в таблицу 4:

Таблица – 4 Результаты исследований

Наименование образца	Активность каталазы	Результаты исследований, класс молока	
		с метиленовым голубым	с резазурином
1	2	3	4

Контрольные вопросы:

1. Что такое каталаза?
2. Значение определения каталазы в молочной промышленности.
3. Сформулируйте сущность и методику определения активности каталазы в молоке.
4. Как рассчитывается активность каталазы?
5. Приготовление реактивов к анализу.
6. Охарактеризуйте фермент редуктаза.
7. Отличие проб на редуктазу с метиленовым голубым и резазурином.
8. Какое свойство редуктазы позволяет использовать ее в контроле бактериальной обсемененности молока?

2.2 Биотехнологические методы оценки качества молочных продуктов

Для разрушения микроорганизмов и инактивации сырьевых ферментов при выработке пищевых продуктов сырье подвергают тепловой обработке. Основная цель тепловой обработки пищевых продуктов – получить при минимальном изменении нативных свойств продукта (цвета, вкуса, пищевой и биологической ценности) безопасный в гигиеническом отношении продукт и увеличить срок его хранения. В молочной промышленности применяют два вида высокотемпературной обработки – пастеризацию и стерилизацию.

Пастеризация – нагревание молока до температуры не более 100°C с разным временем выдержки (от 30 минут до нескольких секунд). Свое название процесс получил по имени французского ученого Луи Пастера, которые впервые установил губительное действие на микробы высоких температур и применил их для обработки продуктов с целью их сохранения.

Молоко пастеризуется на предприятиях при его переработке на любые молочные продукты. Пастеризация убивает вегетативные формы бактерий, при этом споровые формы микроорганизмов не уничтожаются. Тепловая обработка вызывает тепловую денатурацию ферментов молока, тем самым имеет важное практическое значение.

Ферменты, являясь белками, обладают рядом характерных для этого класса органических соединений свойств, отличающихся от свойств неорганических катализаторов.

Скорость большинства химических реакций зависит от температуры, поэтому катализируемые ферментами реакции также чувствительны к изменениям температуры. Скорость химической реакции повышается в 2 раза при повышении температуры на 10 °C. Однако вследствие белковой природы катализатора тепловая денатурация при повышении температуры будет снижать скорость реакции. Так, при температуре, не превышающей 45-50 °C, скорость реакции увеличивается согласно теории химической кинетики. При температуре выше 50 °C на скорость реакции большое влияние начинает оказывать тепловая денатурация белка-фермента, приводящая к полному прекращению ферментативного процесса.

Таким образом, термолабильность, или чувствительность к повышению температуры, является одним из характерных свойств ферментов, резко отличающих их от неорганических катализаторов. В присутствии последних скорость реакции возрастает экспоненциально при повышении температуры. При 100 °С почти все ферменты утрачивают свою активность (исключение составляет, очевидно, только один фермент мышечной ткани – миокиназа, которая выдерживает нагревание до 100 °С).

Оптимальная для действия большинства ферментов теплокровных животных является температура 40 °С. При низких температурах (0 °С и ниже) ферменты, как правило, не разрушаются, хотя активность их падает почти до нуля. Именно этим свойством пользуются при консервировании и термообработке продуктов питания (стерилизация, пастеризация, замораживание), тем самым останавливая биохимические процессы с участием ферментов микроорганизмов. Примером таких ферментов могут служить фосфатаза, пероксидаза. Наличие фермента в сырье или продукте позволяет говорить о недостаточности той или иной тепловой обработки или о несоблюдении температурного режима, что является нарушением технологического процесса. Следовательно, продукт может быть потенциально опасен в бактериальном обсеменении. В молочной промышленности для определения эффективности пастеризации молока, сливок, пахты, сыворотки, а также сырья, использованного при выработке творога, сметаны, сливочного масла, кисломолочных напитков и других молочных продуктов, применяют пробы именно на пероксидазу и фосфатазу.

Лабораторная работа № 2

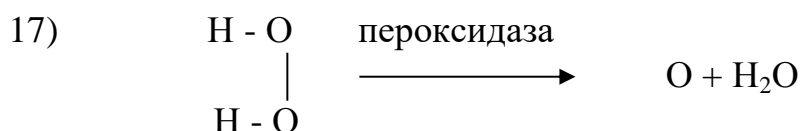
Определение активности лактопероксидазы и фосфатазы

Цель работы. Освоить биотехнологические методы оценки качества молочных продуктов.

Задачи. Провести оценку эффективности пастеризации молока по активности фермента пероксидаза в присутствии парафенилендиамина и йодистокалиевого крахмала, оценить активность фосфатазы в молоке-сырье и в молоке после термической обработки.

Проба на лактопероксидазу с хлоридом парафенилендиамина

Пероксидаза – фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, катализирующий окислительно-восстановительные реакции в присутствии перекиси водорода, лежащие в основе процессов биологического окисления. Пероксидаза окисляет полифенолы, ароматические амины, а также некоторые неорганические соединения (KI, и др.) за счет активного атомарного кислорода, отщепляемого от перекисей:



Пероксидаза - двухкомпонентный фермент, димер, гликогемопроteid, его молекулярная масса составляет около 76000-93000 Да. Оптимальное значение рН 6,0-7,0, изоэлектрическая точка фермента – рН 9,6, оптимальная температура 20-25 °С.

Источниками нативной пероксидазы в молоке являются секреторные клетки молочной железы и лейкоциты крови (миелпероксидаза), фермент связан с альбуминовой фракцией молока. В молоке содержится 3-10 мг% пероксидазы, причем в молозиве ее содержание повышено. В свежесвыдоенном молоке активность фермента достаточно высокая и составляет 370 нкат.

Лактопероксидаза также как и тиоцианат молока, и перекись водорода обеспечивают антибактериальные свойства свежесвыдоенного молока. Это происходит за счет способности лактопероксидазы катализировать окисление тиоцианата до гипотиоцианата и других веществ, способных подавлять жизнедеятельность микроорганизмов, особенно грамотрицательных, в том числе и патогенных.

Пероксидаза может быть также и бактериального происхождения, однако молочнокислые бактерии не выделяют пероксидазу, и, следовательно, они не могут быть источниками пероксидазы в молоке.

При нагревании молока выше 80 °С фермент полностью инактивируется, поэтому это свойство фермента используется для контроля пастеризации молока при высоких температурах.

Подготовка проб. Для проведения анализа пастеризованного молока, сливок, кисломолочных напитков, простокваши дополнительной подготовки не требуется. Творог и сметану необходимо развести дистиллированной водой. Для этого 1 г творога и сметаны помещают в пробирку и тщательно перемешивают с 2 см³ дистиллированной воды.

Кисломолочные напитки с плодово-ягодными наполнителями необходимо профильтровать через бумажный фильтр с активным углем (2 г активного угля на 25 см³ продукта). Сыворотку и фильтраты кисломолочных напитков с плодово-ягодными наполнителями следует нейтрализовать 1 н. раствором гидроксида натрия до рН 6, контролируя по универсальной индикаторной бумажке.

Методика определения. Метод основан на разложении перекиси водорода ферментом пероксидазой, содержащейся в молоке и молочных продуктах. Освобождающийся при разложении перекиси водорода активный кислород окисляет парафенилендиамин, образуя соединение синего цвета.

Ход работы. В пробирку отмеривают или отвешивают анализируемый продукт: пастеризованное молоко, кисломолочные напитки и напитки с наполнителями – 5 см³, сливки, сметану, творог, творожные изделия и пасты, сливочное масло – 2-3 см³ (г). Затем добавляют 2-3 см³ дистиллированной воды.

Кисломолочные напитки с плодово-ягодными наполнителями фильтруют через бумажный фильтр.

Для получения 2-3 см³ плазмы масла 50 г сливочного масла расплавляют при температуре не выше 50°С, затем охлаждают и застывший слой жира удаляют.

После добавления воды, анализируемые продукты тщательно растирают стеклянной палочкой, затем приливают 2,5 см³ буферной смеси (реактив 1), тщательно перемешивают стеклянной палочкой и помещают в водяную баню с температурой воды 35±2°С, где выдерживают 3-5 мин, чтобы содержимое пробирки довести до этой температуры. Затем добавляют 6 капель 0,5%-ного раствора перекиси водорода (реактив 2) и 3 капли раствора хлорида парафенилендиамина (реактив 3), перемешивают вращательными движениями содержимое пробирки после добавления каждого реактива. Снова помещают пробирку в водяную баню и наблюдают изменение окраски жидкости.

При отсутствии фермента пероксидазы в молоке и молочных продуктах цвет содержимого пробирки не меняется. Следовательно, молоко и молочные продукты подвергались пастеризации при температуре не ниже 80°С.

При наличии пероксидазы в молоке, сливках, сливочном масле содержимое пробирок окрашивается в темно-синий цвет. При наличии пероксидазы в кисломолочных продуктах и кислосливочном масле содержимое пробирок приобретает серо-фиолетовую окраску, переходящую в темно-синюю. Следовательно, молоко и молочные продукты или не были пастеризованы, или подвергались пастеризации при температуре ниже 80°С, или были смешаны с непастеризованными продуктами. Чувствительность метода позволяет обнаружить добавление не менее 5% непастеризованных молочных продуктов к пастеризованным.

Приготовление реактивов:

Реактив 1 (буферная смесь). 97 г дифосфата натрия и 0,65 г лимонной кислоты, взвешенных с погрешностью не более 0,0002 г, растворяют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 500 см³, доливают до метки и перемешивают. Буферную смесь следует сохранять в склянке из темного стекла с плотно закрытой пробкой.

Реактив 2 (0,5%-ный раствор перекиси водорода). Имеющийся концентрированный раствор в зависимости от содержания в нем перекиси водорода разводят водой, предварительно прокипяченной и охлажденной. Раствор быстро разлагается, поэтому его готовят в небольшом количестве.

Растворы следует хранить в склянке из темного стекла в прохладном месте.

Для определения содержания перекиси водорода в концентрированном растворе 3-4 г концентрированного перекиси водорода, взвешенного с погрешностью не более 0,01 г, переносят без потерь в мерную колбу вместимостью 250 см³, доводят водой до метки и перемешивают. 10 см³ приготовленного раствора переносят в коническую колбу вместимостью 250 см³, добавляют 50 см³ воды, 10 см³ разбавленной серной кислоты (1 : 4) и содержимое титруют 0,1 н. раствором перманганата калия до розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. Параллельно проводят контрольный опыт в тех же условиях, с тем же количеством реактивов и воды (без перекиси водорода).

Массовую долю перекиси водорода X (%) вычисляют по формуле:

$$18) X = \frac{(V - V_1) \cdot 0,0017 \cdot 25 \cdot 100}{m},$$

где V – объем 0,1 н. раствора перманганата калия, израсходованного на титрование раствора перекиси водорода, см^3 ;

V_1 – объем 0,1 н. раствора перманганата калия, израсходованного на контрольное титрование, см^3 ;

0,0017 – масса перекиси водорода, соответствующая 1 см^3 0,1 н. раствора перманганата калия, г;

m – навеска перекиси водорода, г.

Проверка пригодности реактива 3 (2%-ного раствора солянокислого парафенилендиамина). Для проверки раствора, хранившегося более 1-2 дней в пробирке кипятят 5 см^3 молока, охлаждают, приливают 2,5 см^3 буферной смеси, перемешивают и помещают на 3-5 мин в водяную баню с температурой воды $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем прибавляют 6 капель 0,5%-ного раствора перекиси водорода и 3 капли раствора хлорида парафенилендиамина, перемешивают и снова помещают в водяную баню. Появление темно-синей или серовато-синей окраски указывает на непригодность раствора.

Проба на пероксидазу с йодистокалиевым крахмалом

Методика определения. Метод основан на разложении перекиси водорода ферментом пероксидазой. Освобождающийся при разложении перекиси водорода активный кислород окисляет йодид калия, освобождая йод, образующий с крахмалом соединение синего цвета.

Ход работы. Отмеривание или взвешивание анализируемых продуктов и воды, подготовку плазмы масла проводят, как указано в пробе на пероксидазу, с хлоридом парафенилендиамина.

В пробирку с указанным количеством продукта и воды приливают 5 капель раствора йодистокалиевого крахмала (реактив 1) и 5 капель 0,5%-ного раствора перекиси водорода (реактив 2), вращательными движениями перемешивают содержимое пробирки после добавления каждого реактива. Затем определяют наличие пероксидазы по изменению окраски.

Если применяют отдельно раствор крахмала и йодида калия, то поступают следующим образом: в каждую пробирку с продуктами приливают 0,5 см^3 1%-ного раствора крахмала, 2 капли 10%-ного раствора йодида калия и 5 капель 0,5%-ного раствора перекиси водорода, перемешивают содержимое пробирок после добавления каждого реактива, затем определяют наличие пероксидазы по изменению окраски.

При отсутствии пероксидазы в молоке и молочных продуктах цвет содержимого пробирки не изменяется. Следовательно, молоко и молочные продукты пастеризовали при температуре не ниже 80°C .

При наличии пероксидазы в молоке, сливках, сливочном масле содержимое пробирок приобретает темно-синюю окраску. При наличии пероксидазы в кисломолочных продуктах и кислосливочном масле содержимое пробирок не более чем через 2 мин приобретает серовато-синюю окраску, постепенно переходящую в темно-синюю. Следовательно, продукты или не пастеризовали, или пастеризовали при температуре ниже 80°C , или смешали с непастеризованными

молочными продуктами. Появление окраски в пробирках более чем через 2 мин после добавления йодистокалиевого крахмала и пероксида водорода не указывает на отсутствие пастеризации, так как может вызываться разложением реактивов.

Чувствительность метода позволяет обнаружить добавление не менее 5% непастеризованных молочных продуктов к пастеризованным, а для напитков с плодово-ягодными наполнителями – 0,5%.

Приготовление реактивов:

Реактив 1 (раствор йодистокалиевого крахмала). 3 г крахмала взвешивают с погрешностью не более 0,01 г и смешивают с 5-10 см³ дистиллированной холодной воды до получения однородной массы без комочков. Отдельно в колбе доводят до кипения 100 см³ дистиллированной воды и при непрерывном помешивании приливают воду к разведенному крахмалу, не допуская образования комков. Полученный раствор доводят до кипения. После охлаждения к раствору крахмала прибавляют 3 г йодида калия, перемешивая до растворения кристаллов соли.

Раствор йодистокалиевого крахмала является нестойким реактивом, поэтому готовить его следует в небольшом количестве и сохранять в темном прохладном месте не более 2 дней.

Для определения пригодности йодистокалиевого крахмала, хранившегося более 2 дней, перед употреблением его необходимо проверить. Для этого в пробирке нужно вскипятить 5 см³ молока, охладить, прилить 5 капель раствора йодистокалиевого крахмала и 5 капель 0,5%-ного раствора перекиси водорода и перемешать. Появление темно-синей или серовато-синей окраски указывает на непригодность раствора.

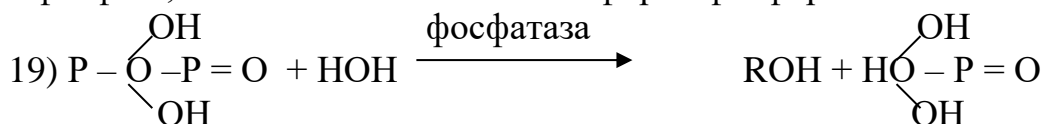
Допускается вместо йодистокалиевого крахмала применять отдельно приготовленные 1%-ный раствор крахмала и 10%-ный раствор йодида калия.

Реактив 2 готовят, как указано в пробе на пероксидазу, с солянокислым парафенилендиаминном.

Результаты исследований внести в таблицу 6.

Проба на фосфатазу по реакции с 4-аминоантипирином (арбитражный метод)

Фосфатаза – это фермент, относящийся к классу гидролаз, катализирует расщепление сложных эфиров фосфорной кислоты с образованием неорганического фосфата, а также синтез сложных эфиров фосфорной кислоты.



В свежесвыдоенном молоке обнаружены щелочная и кислая фосфатаза.

Щелочная фосфатаза – двухкомпонентный фермент, димер. В активном центре имеет цинк, поэтому активность фермента подавляется комплексообразователями. Его молекулярная масса составляет 180 000-190 000, оптимум действия находится при рН=9,0-10,0 и температуре 37°С. Фосфатаза не устойчива к

нагреванию, поэтому реакцию на фосфатазу в молоке и молочных продуктах производят с целью контроля пастеризации молока. Фосфатаза обладает большей чувствительностью к нагреванию в сравнении с пероксидазой, она инактивируется при температуре пастеризации ниже 80 °С.

Щелочная фосфатаза термолabile: разрушается при нагревании молока до 60°С в течение 15 минут, а также при кратковременном действии температур 72-72°С и выше. Фермент способен к реактивации при хранении молока и сливок после кратковременной высокотемпературной пастеризации.

Активность щелочной фосфатазы в свежесвыдоенном молоке составляет 2,0-4,5 нкат.

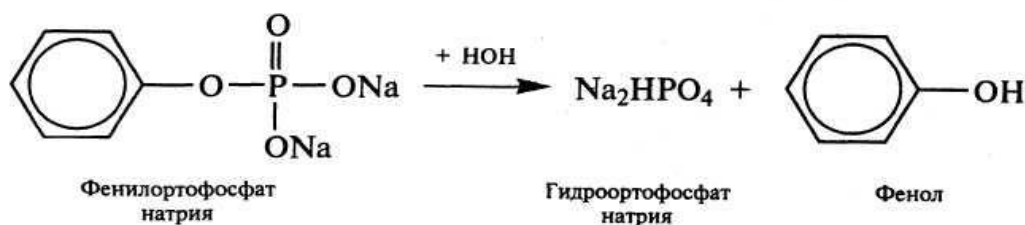
Нативная щелочная фосфатаза секретируется клетками молочной железы, а также попадает в молоко из крови. 60% ее концентрируется в оболочках жировых шариков, 40 – связано с белками.

При сепарировании 60% нативной щелочной фосфатазы переходит в обезжиренное молоко. При развитии в молоке микроорганизмов образуется бактериальная фосфатаза.

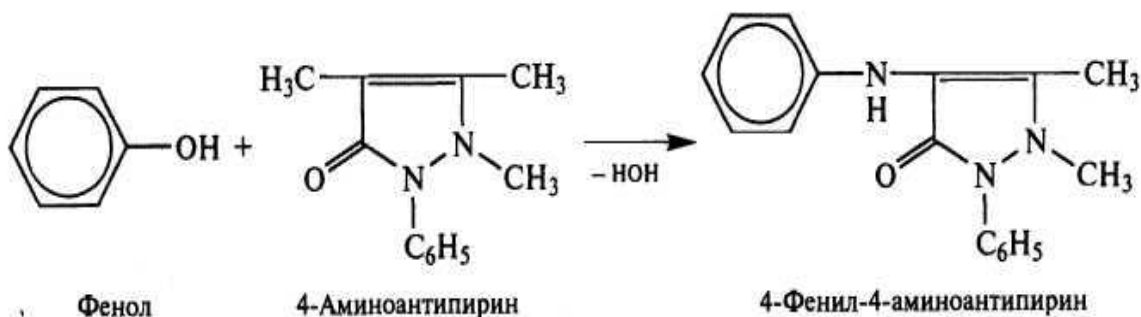
Методика определения. Метод основан на гидролизе динатриевой соли фенолфосфорной кислоты ферментом фосфатазой, содержащейся в молоке и молочных продуктах. Выделившийся при гидролизе свободный фенол в присутствии окислителя дает розовое окрашивание с 4-аминоантипирином. Для прекращения действия фосфатазы и осаждения белков применяют цинк-медный осадитель (ГОСТ 3623).

Реакции, описывающие сущность метода представлены уравнениями:

20)



21)



Реакция протекает в щелочной среде (рН=10,0±0,2) при слабом нагревании (температура около 40°С).

Белки молока препятствуют оценке результатов опыта, поэтому их осаждают смесью растворов сульфата цинка и меди.

Подготовка проб. Для проведения анализа пастеризованного молока, сливок, кисломолочных напитков, простокваши дополнительной подготовки не требуется. Творог и сметану необходимо развести дистиллированной водой. Для этого 1 г творога и сметаны помещают в пробирку и тщательно перемешивают с 2 см³ дистиллированной воды.

Кисломолочные напитки с плодово-ягодными наполнителями необходимо профильтровать через бумажный фильтр с активным углем (2 г активного угля на 25 см³ продукта). Сыворотку и фильтраты кисломолочных напитков с плодово-ягодными наполнителями следует нейтрализовать 0,1 н. раствором гидроксида натрия до pH 6, контролируя по универсальной индикаторной бумажке.

В пробирки из бесцветного стекла отмеривают или отвешивают следующее количество продуктов, воды и реактивов (см. таблицу 5).

После этого, закрыв пробирки резиновыми пробками, взбалтывают. Кисломолочные продукты в пробирках предварительно смешивают с водой стеклянной палочкой. Помещают пробирки в водяную баню с температурой 40-45°C и определяют окраску содержимого пробирок через 10 минут и через один час. Если исследуемое молоко и сливки не были пастеризованы, то содержимое пробирок приобретает окраску от светло-розовой до ярко-розовой.

Приборы. Штатив с пробирками; пипетка вместимостью 2 см³; пипетки градуированные вместимостью 5 см³; водяная баня или термостат с температурой 40-45 °С.

Таблица - 5 Количество продуктов и реактивов для определения эффективности пастеризации

Продукты	Количество, г (см ³)			
	Продукта, г	Вода, см ³	0,1н NaOH, см ³	Фенолфталеин-фосфата Na, см ³
Молоко цельное или обезжиренное	2	-	-	1
Сливки, сливочный напиток	2	2	-	1
Кефир, простокваша, ацидофильное молоко, ацидофилин, кумыс	2	2	-	2
Сметана	2	2	-	2
Творог, паста ацидофильная	2	-	4	2

Материалы и реактивы. Молоко сырое, пастеризованное и кипяченое; смесь динатрийфенилфосфата с 4-аминоантипирином (раствор субстрата); осадитель системы цинк-медь.

Ход работы. К 3 см³ молока, сливок, кефира, простокваши, сыворотки или предварительно подготовленных для анализа продуктов добавляют 2 см³ рабочего раствора субстрата (реактив 1). Затем перемешивают содержимое пробирки и ставят в водяную баню, нагретую до 40-45°C на 30 мин. В пробирку, выну-

тую из водяной бани, добавляют 5 см³ осадителя системы цинк-медь (реактив 2), тщательно перемешивают содержимое пробирки и снова ставят в водяную баню с температурой 40-45°C на 10 мин. Вынув пробирку из бани, производят визуальное сравнение содержимого пробирки испытуемого продукта с контрольным опытом.

Контрольным опытом для всех продуктов является аналогичная реакция с кипяченым молоком. Если контрольный опыт с кипяченым молоком дает слабо-розовое окрашивание, динатрийфенилфосфат подлежит дополнительной очистке.

При отсутствии фермента фосфатазы в молоке и молочных продуктах окраска содержимого пробирки (раствора, отделившегося от осажденного белка) аналогична содержимому пробирок контрольного опыта. Следовательно, молоко и молочные продукты пастеризовали при температуре не ниже 63°C.

При наличии фосфатазы в молоке и молочных продуктах содержимое пробирок (растворы) окрашено от розового до темно-красного цвета. Следовательно, молоко и молочные продукты не подвергались пастеризации при температуре ниже 63°C или были смешаны с непастеризованными молочными продуктами.

При оценке реакции учитывают только цвет, но не прозрачность раствора. Чувствительность метода позволяет обнаружить добавление непастеризованных молочных продуктов к пастеризованным: 0,3% в молоке, сливках, кисломолочных напитках, 0,5% в твороге и сметане и 1% в напитках с плодово-ягодными наполнителями и сыворотке.

Творог и сметану на пастеризацию исходного сырья – молока и сливок определяют по фосфатазе не позднее 7 суток с момента выработки творога, сметаны – не позднее 5 суток. Продукты из молочной сыворотки проверяют путем контроля исходного сырья (молока, сливок, творога, сыворотки).

Приготовление реактивов:

Реактив 1 (рабочий раствор субстрата). Готовят непосредственно перед определением реакции смешиванием раствора А и Б (1 : 9). Рабочий раствор пригоден для работы в течение 8 ч при хранении его в склянке из темного стекла.

Приготовление раствора А – 1,25 г динатриевой соли фенилфосфорной кислоты взвешивают с погрешностью не более 0,0002 г, растворяют в 100 см³ основного буферного раствора (рН 10±0,2), который приготавливают следующим образом. 40 г хлорида аммония, взвешенного с погрешностью не более 0,01 г, растворяют в 100-200 см³ дистиллированной воды, добавляют 348 см³ 25%-ного водного аммиака и доводят до 1000 см³ дистиллированной водой. При необходимости динатриевую соль фенилфосфорной кислоты очищают от свободного фенола промыванием этиловым эфиром до полного удаления фенола. Сушат реактив при комнатной температуре под тягой.

Приготовление раствора Б – 0,8 г 4-аминоантипирин взвешивают с погрешностью не более 0,0002 г, растворяют в 900 см³ дистиллированной воды.

Растворы А и Б должны быть бесцветными и храниться в склянках из темного стекла в холодильнике. Срок хранения не более 1 мес. Пожелтевшие растворы для работы не пригодны.

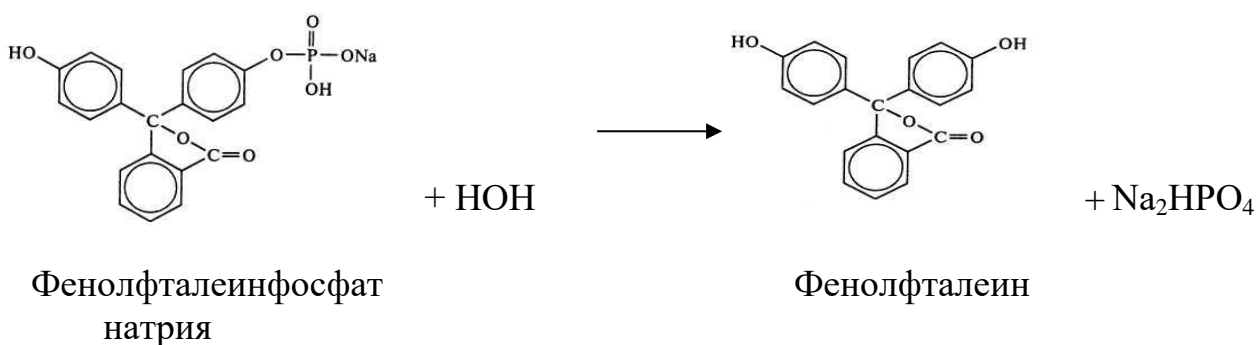
Реактив 2 (осадитель системы цинк-медь). 30 г сульфата цинка и 6 г сульфата меди, взвешенных с погрешностью не более 0,01 г, растворяют в 1000 см³ дистиллированной воды.

Проба на фосфатазу по реакции с фенолфталеинфосфатом натрия

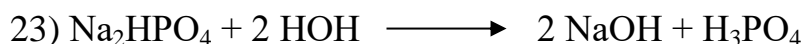
Методика определения. Метод основан на гидролизе фенолфталеинфосфата натрия ферментом фосфатазой. Освобождающийся при гидролизе фенолфталеин придает молоку в щелочной среде (при pH=8,2-10,0) розовое или малиново-красное окрашивание.

Реакции, описывающие сущность метода, представлены следующими уравнениями.

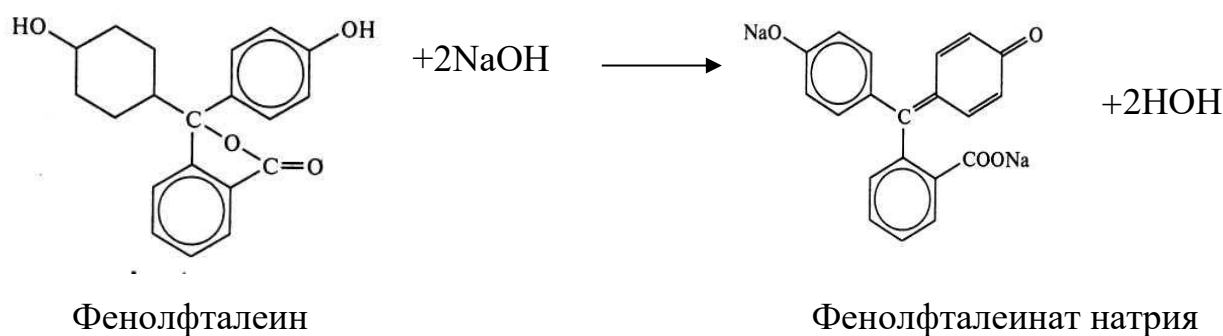
22)



Гидроортофосфат натрия подвергается гидролизу с образованием гидроксида натрия и фосфорной кислоты:



24)



Фосфорная кислота нейтрализуется гидроксидом аммония, содержащимся в буферном растворе, а гидроксид натрия реагирует с фенолфталеином с образованием окрашенного в красно-малиновый цвет фенолфталеината натрия.

Приборы. Штатив с пробирками; пипетка вместимостью 2 см³; пипетки градуированные вместимостью 5 см³; водяная баня или термостат с температурой 40-45°C.

Материалы и реактивы. Молоко сырое, пастеризованное и кипяченое; фенолфталеинфосфат натрия.

Выполнение работы. В пробирку отмеривают 2 см³ анализируемого продукта, 2 см³ дистиллированной воды (в пастеризованное молоко воду не добавляют) и раствор фенолфталеинфосфата натрия (реактив 1). Его вносят в объеме 1 см³ – в пастеризованное молоко и сливки и 2 см³ – в кисломолочные напитки.

После добавления дистиллированной воды и реактива содержимое пробирки закрывают пробкой и взбалтывают. Затем пробирку помещают в водяную баню с температурой воды от 40 до 45°C и определяют окраску содержимого пробирки через 10 мин и через 1 ч.

При отсутствии фермента фосфатазы в молоке и молочных продуктах окраска содержимого пробирки не изменяется. Следовательно, молоко и молочные продукты подвергались пастеризации при температуре не ниже 63°C. При наличии фосфатазы в молоке и молочных продуктах содержимое пробирки приобретает окраску от светло-розовой до ярко-розовой. Следовательно, молоко и молочные продукты не подвергались пастеризации или подвергались пастеризации при температуре ниже 63°C, или были смешаны с непастеризованными продуктами.

Чувствительность метода позволяет обнаружить добавление не менее 2% непастеризованных молочных продуктов к пастеризованным.

Приготовление реактива. Для приготовления 0,1%-ного раствора фенолфталеинфосфата натрия 0,1 г порошкообразного фенолфталеинфосфата натрия, взвешенного с погрешностью не более 0,0002 г, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ с небольшим количеством аммиачной буферной смеси, затем доливают буферную смесь до метки и перемешивают.

Аммиачную буферную смесь готовят смешиванием 80 см³ 1 М раствора аммиака с 20 см³ 1 М раствора хлорида аммония (рН 9,8).

Метод определения кислой фосфатазы

Кислая фосфатаза инактивируется при температуре пастеризации молока и сливок 85°C и выдержке не менее 30 мин, 90°C и выдержке не менее 5 мин или кипячении; при температуре термической обработки сливок 103°C и выдержке 15-20 с.

Методика определения. Метод основан на свойстве кислой фосфатазы катализировать при рН 4,00±0,05 гидролиз динатриевой соли фенолфосфорной кислоты с образованием фенола и фосфата натрия. Фенол с 4-аминоантипирином при добавлении осадителя системы цинк-медь в условиях щелочной реакции образует окрашенное соединение, изменяющее интенсивность окраски от слабо-розовой до темно-вишневой (в зависимости от концентрации фенола). По разнице в интенсивности окраски опытных и контрольных проб определяют активность кислой фосфатазы (соблюдены ли режимы термической обработки).

Приборы. Штатив с пробирками; пипетка вместимостью 2 см³; пипетки градуированные вместимостью 5 см³; водяная баня или термостат с температурой 40-45 °С.

Материалы и реактивы. Молоко сырое, пастеризованное и кипяченое; смесь динатрийфенилфосфата с 4-аминоантипирином (раствор субстрата); осадитель системы цинк-медь.

Выполнение работы. Проведение анализа начинают с приготовления опытной пробы. Исследуемое молоко или сливки вносят по 1 см³ в 3 пробирки. В одну из пробирок с молоком или сливками добавляют 10 см³ раствора динатриевой соли фенилфосфорной кислоты и 4-аминоантипирина (реактив 1), перемешивают, помещают в водяную баню или ультратермостат с температурой 36±1°С. Через одинаковые промежутки времени, например 1 мин, вышеуказанную операцию проводят последовательно с остальными 2 пробирками. Продолжительность выдерживания каждой из 3 пробирок в водяной бане или ультратермостате, контролируемая по секундомеру, составляет 90 мин. Затем вносят из бюретки вместимостью 25 см³ или отмеривают пипеткой по 1 см³ осадителя системы цинк-медь (реактив 2), 0,6 см³ раствора с концентрацией аммиака 3 моль/дм³ (реактив 3) через те же промежутки времени, как и при смешивании с раствором соли фенилфосфорной кислоты и 4-аминоантипирина, перемешивают после добавления каждого реактива, фильтруют и выдерживают 60 мин при температуре 20±5°С.

Контрольную пробу готовят следующим образом: в 3 пробирки вносят по 10 см³ раствора динатриевой соли фенилфосфорной кислоты и 4-аминоантипирина (реактив 1), выдерживают, подобно опытным пробам, при температуре 36±1°С в течение 90 мин. Пробирки вынимают из водяной бани или ультратермостата, добавляют по 1 см³ осадителя системы цинк-медь (реактив 2), 1 см³ исследуемых молока или сливок и 0,6 см³ раствора с концентрацией аммиака 3 моль/дм³ (реактив 3) (перемешивание выполняют после каждой добавки), фильтруют и выдерживают 60 мин при температуре 20±5°С.

Во избежание попадания в содержимое пробирок постороннего фенола пробирки типа П2 закрывают фольгой, перемешивают, дважды переворачивая их.

При полной инактивации кислой фосфатазы в молоке или сливках окраска опытных проб не отличается от окраски контрольных проб. Следовательно, молоко и сливки подвергались пастеризации при температуре 85°С с выдержкой не менее 30 мин, 90°С с выдержкой не менее 5 мин и кипячению; сливки подвергались термической обработке при температуре 103°С с выдержкой 15-20 с.

В зависимости от активности кислой фосфатазы в молоке и сливках окраска опытных проб изменяет цвет от слабо-розового (но более яркого, чем окраска контрольных проб) до темно-вишневого. Следовательно, наличие активности кислой фосфатазы свидетельствует о несоблюдении режимов термической обработки.

Приготовление реактивов:

Реактив 1 (раствор динатриевой или фенолфосфорной кислоты и 4-аминоантипирин). В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 0,300±0,001 г динатриевой соли фенолфосфорной кислоты и 0,021±0,001 г 4-аминоантипирин, 80 см³ дистиллированной воды, содержимое растворяют, добавляют 10 см³ буферного раствора, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа, хранят в темном месте не более 2 ч.

Буферный раствор готовят следующим способом: в мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят 72 см³ ледяной уксусной кислоты, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Затем подщелачивают концентрированным раствором гидроксида натрия до pH 3,78±0,05.

Реактив 2 (осадитель системы цинк-медь). В мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят 150,00±0,05 г сульфата цинка и 30,00±0,05 г сульфата меди, растворяют в дистиллированной воде и перемешивают.

Реактив 3 (раствор аммиака концентрацией 3 моль/дм³). В мерной колбе вместимостью 1000 см³ разбавляют 333 см³ аммиака с массовой долей 25% до метки дистиллированной водой.

Раствор аммиака хранят в плотно закупоренной посуде. Перед взятием аммиака содержимое бутылки перемешивают.

Результаты исследований внести в таблицу 6:

Таблица 6 - Результаты исследований

Наименование образца	Наличие пероксидазы	Наличие фосфатазы
1	2	3

Контрольные вопросы:

1. Что такое пероксидаза?
2. Дайте характеристику ферменту фосфатаза.
3. Значение определения пероксидазы и фосфатазы в молочной промышленности.
4. Сформулируйте сущность методов определения пероксидазы и фосфатазы в молоке и молочных продуктах.
5. Как осуществляется подготовка образцов продуктов к анализам?
6. Приготовление реактивов к анализам.
7. В чем практическое различие использования определения пероксидазы и фосфатазы?

3. МИКРОБНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

В настоящее время достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях:

- в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) — использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами на основе микробиологического синтеза;
- в экологии — повышение эффективности экологизированной защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем;
- в энергетике — применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и моделированных фотосинтетических процессов, биоконверсии биомассы в биогаз;
- в сельском хозяйстве — разработка в области растениеводства трансгенных агрокультур, биологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, микробиологических методов.

Высока роль микроорганизмов в получении пищевых продуктов. Микроорганизмы широко используются при приготовлении хлеба, вина, молочнокислых продуктов и мясных изделий, на базе микробных процессов производится биологически ценные пищевые продукты. Одним из основных методов обработки молочного сырья является использование микроорганизмов при производстве, например, молочных продуктов, таких как кисломолочные напитки, творожные изделия, сыры и др.

В молочном сырье под действием бактерий рода *Leuconostoc* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*, *Vifidobacteria*, *Enterococci* и др. в результате молочнокислого брожения и ферментативной активности происходит расщепление лактозы до глюкозы и галактозы и далее до молочной кислоты. При этом протекающие параллельно молочнокислому брожению побочные процессы способствуют накоплению продуктов распада лактозы – летучих кислот, спиртов, диацетила. Дрожжи, вносимые в сырье, обуславливают протекание спиртового брожения, в результате которого лактоза расщепляется до этанола и диоксида углерода.

Микробная биотехнология применяется в производстве мясных изделий при созревании, посоле мясного сырья, составлении фарша, особенно фаршей сыровяленых и сырокопченых колбас. Применение определенных штаммов микроорганизмов, за счет ферментно-микробиологических процессов их жизнедеятельности, способствует формированию желательных органолептических и функционально-технических свойств сырья и готового продукта.

В мясной промышленности широкое распространение получило применение стартовых культур молочнокислых и бифидобактерий.

Стартовая культура – это исходные штаммы микроорганизмов, получаемые из лабораторных чистых культур, которые выращивают разными способами

ми на предварительно стерилизованной твердой или жидкой питательной среде для использования в перерабатывающей отрасли при приготовлении рабочих заквасок и прямом внесении с целью интенсификации технологического процесса.

В мясной промышленности применяют молочнокислые лактобактерии, лактококки, бифидобактерии. Лактобактерии и лактококки сбраживают углеводы, образуя молочную и другие органические кислоты. Их применяют для ускорения созревания мясного сырья, улучшения его органолептических свойств и повышения качества готовых изделий. Положительный эффект молочнокислых бактерий при воздействии на мясное сырье заключается в понижении рН мяса, улучшении санитарно-гигиенического состава, повышении биологической ценности, улучшении аромата, вкуса и консистенции сырья и готового продукта. Штаммы *Streptococcus lactis* и *Lactobacillus plantarum* являются активными кислотообразователями, устойчивы к действию высоких концентраций NaCl, применяются при посоле мясного сырья. Из аргинина производят диацетил и ацетин, сбраживают лактозу до молочной кислоты, при этом процессы их жизнедеятельности сопровождаются слабым образованием CO₂. Применение *Streptococcus cremoris* способствует образованию вязкой консистенции фарша. Введение в сырье *Streptococcus diacetylactis* способствует расщеплению цитрата в присутствии сбраживаемого углевода, с образованием CO₂. *Streptococcus diacetylactis* сильный ароматообразователь, оказывает подавляющее воздействие на нежелательные и патогенные микроорганизмы, поэтому его применяют при обработке мясного сырья в процессе его созревания. При производстве ферментированных соленых, сыровяленых, сырокопченых мясных продуктов используют штаммы бактерий *Macrococcus caseolyticus*, *Staphylococcus micrococcus*, *Hatemonas* spp..., *Penicillium* sp..

В результате углеводного обмена микроорганизмов образуются молочная, пировиноградная, винная, уксусная кислоты, этанол, ацетоин, ацетальдегид и другие вещества, придающие сырью и мясным продуктам долго сохраняющийся вкус и аромат. Бактерии *Lactobacillus* и *Leuconostoc* в процессе своей жизнедеятельности продуцируют липазы расщепляющие жиры до свободных жирных кислот и карбонильных соединений, играющих важную роль в формировании аромата.

Штаммы молочнокислых бактерий, таких как, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, (lb) *Lactobacillus casei* применяются для целенаправленной модификации органолептических и функциональных свойств коллагенсодержащего сырья (сухожилий, пленок, связок, коллагенсодержащих субпродуктов, шквары) для улучшения их биологической ценности и технологических свойств.

Лабораторная работа № 3

Определение лактазной (β -галактозидазной) активности

Цель работы. Освоить метод оценки β - галактозидазной активности молочнокислых бактерий.

Задачи. Определить титруемую кислотность молока и кисломолочных напитков, рассчитать количество молочной кислоты и сброженной лактозы в исследуемых образцах.

β -галактозидаза (Н.Ф. 3.2.1.23). Фермент, который другими словами называют лактазой, катализирует реакцию гидролитического расщепления молочного сахара дисахарида лактозы на глюкозу и галактозу.

Ферментные препараты β -галактозидазы, применяемые в молочной промышленности, получают с помощью различных продуцентов: микроскопических грибов: (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*), бактерий (*E. Coli*, *Lactobacilli*), дрожжей (*S. fragilis*, *S. psedotropicalis*). Лактаза имеет оптимум действия при pH 5,0 и температуре 40°C.

При гидролизе лактозы в цельном молоке, обезжиренном молоке или в концентратах молока оптимальную активность (при нейтральном pH этих субстратов) проявляет дрожжевой фермент; для сыворотки и ее концентратов – грибной. В обезжиренном молоке или сыворотке лактоза гидролизуется легче, а пастеризованные субстраты гидролизуются легче, чем непастеризованные.

β -галактозидаза из *E.coli* была получена в кристаллическом состоянии, ее молекулярная масса 850 000 Да. Она ингибируется некоторыми металлами (цинк, медь). Восстанавливающие агенты (цистеин, сульфид натрия, сульфит натрия и др.) активируют фермент и способны преодолевать влияние ингибиторов-металлов.

В молочной промышленности β -галактозидазу применяют при выработке сгущенного молока с сахаром, низколактозных молочных продуктов, безлактозного детского питания. В последние годы β -галактозидазная активность молочнокислых микроорганизмов является одним из важнейших технологических свойств культур. В последние десятилетия возрастает количество, как взрослых, так и детей, в том числе и новорожденных, у которых наблюдается непереносимость (интолерантность) лактозы, связанная с полным или частичным исчезновением лактозной активности в клетках кишечного эпителия. Получение низколактозных продуктов или внесение β -галактозидазы в молочные продукты поможет решить эту проблему.

Методика определения. β -галактозидазную активность молочнокислых бактерий определяют по их кислотообразующей активности в молоке путем вычисления образовавшейся в процессе сквашивания молочной кислоты.

Энергия кислотообразования или кислотообразующая активность - это титруемая кислотность сгустка, образованного за определенное время. Для этого необходимо определить титруемую кислотность непосредственно после внесения кисломолочной культуры в молоко, а также в полученном сгустке. После образования сгустка пробы оставляют при комнатной температуре на 40-50

мин, после чего помещают в холодильник, где охлаждают до температуры $4 \pm 2^\circ\text{C}$ и затем определяют титруемую кислотность по ГОСТ 3624.

Приборы. Колбы конические вместимостью 150-200 см³; пипетки вместимостью 10 и 20 см³; бюретка вместимостью 20-50 см³; капельница для раствора фенолфталеина; водяная баня или термостат с температурой 40-45 °С.

Материалы и реактивы. Молоко, сливки, кисломолочные продукты; 0,1 н раствор гидроксида натрия; 1%-й спиртовой раствор фенолфталеина, эталон окраски, дистиллированная вода.

Ход работы. Определение титруемой кислотности молока заключается в нейтрализации (титровании) кислых солей, белков, свободных кислот и других кислых соединений молока раствором щелочи в присутствии индикатора фенолфталеина.

Титруемую кислотность молока в нашей стране выражают в градусах Тернера (°Т). Градусы Тернера показывают количество кубических сантиметров 0,1 н (0,1 моль/дм³) раствора гидроксида натрия, необходимое для нейтрализации 100 см³ разбавленного в два раза водой молока. Определение кислотности регламентируется ГОСТ 3624.

Для исследований в стерильное молоко стерильной пипеткой вносят 5% от объема молока заквасочные культуры и термостатируют при оптимальной температуре до образования сгустка, при этом определяют титруемую кислотность молока непосредственно после внесения молочнокислых бактерий и после образования сгустка.

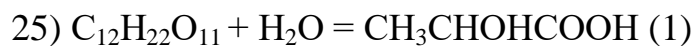
При контроле титруемой кислотности молока в коническую колбу вместимостью 150-200 см³ отмеривают пипеткой 10 см³ молока при температуре 20 °С, прибавляют 20 см³ дистиллированной воды и три капли фенолфталеина. Смесь тщательно перемешивают и титруют раствором гидроксида натрия до появления слабо-розового окрашивания, соответствующего контрольному эталону окраски и не исчезающего в течение 1 мин.

Для определения титруемой кислотности кисломолочных напитков в коническую колбу вместимостью 150—200 см³ вносят 20 см³ воды, прибавляют пипеткой 10 см³ продукта. Пипетку промывают этой смесью, вымывая остатки продукта. Далее определение проводят так же, как и в молоке.

Для приготовления контрольного эталона окраски в такую же колбу вместимостью 150-200 см³ отмеривают пипеткой 10 см³ молока, 20 см³ воды и 1 см³ 2,5%-го раствора сернокислого кобальта. Эталон пригоден для работы в течение 8 ч. Для более длительного хранения эталона, в течение нескольких сто, к нему может быть добавлена 1 капля формалина.

Кислотность молока в градусах Тернера равна объему водного раствора гидроксида натрия, затраченному на нейтрализацию 10 см³ молока, умноженному на 10. Расхождение между параллельными определениями должно быть не более 1 °Т.

При молочнокислом брожении из молекулы лактозы образует 4 моля молочной кислоты:



342 г

18 г

360 г

Количество образовавшейся молочной кислоты в опытах определяют по нарастанию титруемой кислотности молока из расчета, что 1°Т соответствует 1 см³ 0,1 н раствора щелочи или 1 см³ 0,1 н раствора молочной кислоты. Таким образом, 1°Т соответствует:

$$26) \quad \frac{90}{10 \times 100} = 0,09 \text{ г молочной кислоты} \quad (2).$$

При этом количество сброженной лактозы определяют по формуле:

$$27) \quad L = \frac{342 \times 0,09 \times (K_2 - K_1)}{360 \times 10} \quad (3),$$

где L – количество сброженной лактозы, г;

K₁ – начальная кислотность заквашенного молока, °Т;

K₂ – кислотность сгустка после сквашивания, °Т;

0,09 – количество молочной кислоты, соответствующее 1°Т, г;

342 – молекулярный вес лактозы;

360 – молекулярный вес четырех молекул молочной кислоты.

По полученным результатам вычисляют показатель – индекс лактозосбраживающей активности (I_л) по нижеследующей формуле:

$$28) \quad I_{л} = \frac{L}{L_{\max}} \quad (4),$$

где L – количество лактозы, сброженной конкретным штаммом;

L_{max} – максимальное из выборки количество сброженной лактозы.

По результатам исследований заполнить таблицу 7:

Таблица 7 - Результаты исследований

Наименование образца	K ₁ , °Т	K ₂ , °Т	L	I _л
1	2	3	4	5

Контрольные вопросы:

1. Охарактеризуйте фермент β-галактозидазу.
2. Значение лактазы в пищевой и молочной промышленности.
3. Что такое β-галактозидазная активность?
4. В чем сущность методов определения способности штаммов бактерий к ферментации лактозы?
5. Какова последовательность этапов подготовки и определения лактозосбраживающей активности микроорганизмов?

3.1 Технология культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментов

Ферменты присущи всем живым существам, для их выделения целесообразно использовать природные объекты, в которых содержание искомого энзима составляет не менее 1 %. Для крупномасштабного промышленного получения ферментов пригодны только некоторые растительные организмы на определенной фазе их развития (проросшее зерно различных злаков и бобовых, латекс и сок зеленой массы ряда растений), а также отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, сычуг крупного рогатого скота, семенники половозрелых животных). Практически неограниченный источник ферментов — микроорганизмы (бактерии, грибы, дрожжи), содержащие набор большинства известных в настоящее время энзимов, количество которых можно повысить в десятки и сотни раз методами мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

В зависимости от источника технология получения ферментативных препаратов имеет свои особенности. При извлечении ферментов из растительного сырья и животных тканей технология сводится к экстракции энзимов и очистке их от сопутствующих балластных веществ. Технология ферментных препаратов микробного происхождения более сложная, так как дополнительно включает этапы культивирования микроорганизмов — продуцентов ферментов, в том числе этапы получения посевного материала и производственной культуры соответствующего микроорганизма.

Получение высокоэффективных ферментативных препаратов зависит, прежде всего, от производственных стадий, связанных с процессом культивирования микроорганизмов, являющихся продуцентами фермента. До настоящего времени в производстве препаратов широко применяется метод периодического культивирования, при котором микроорганизмы выращивают в замкнутом объеме несменяемого культурального субстрата.

Для производства посевного материала используют исходный штамм продуцентов, получаемый из лабораторных чистых культур, который выращивают разными способами на предварительно стерилизованной твердой или жидкой питательной среде до определенного возраста. Посевной материал консервируют (высушиванием или хранением при низких температурах) вплоть до дальнейшего использования. Производственные культуры продуцента получают, выращивая посевной материал микроорганизмов как на поверхности твердых или жидких сред, так и в глубине жидких питательных сред.

Поверхностный метод выращивания продуцентов, предложенный И. Такаmine еще в 1894 г., состоит в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей, размещенных в кюветах, к которым иногда добавляют солодовые ростки, древесные опилки, свекловичный жом. Инкубацию микроорганизмов ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха.

В последние 15 лет для выращивания продуцентов ферментов чаще используют более экономный — *глубинный метод* культивирования. В промышленных условиях для этих целей применяют ферментеры из нержавеющей стали, снабженные приспособлениями для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

Ферментер – это герметичная емкость, в которой в специально созданных условиях производят культивирование микроорганизмов с целью наращивания биомассы или накопления продуктов метаболизма.

Сначала ферментер заполняют питательной средой, автоклавируют, а затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения инфекции в ферментере поддерживают повышенное давление наряду с оптимальными значениями рН, температуры, редокс-потенциала и другими условиями культивирования.

Известно, что в периодической культуре питательные вещества постепенно исчерпываются, что снижает скорость роста бактерий, а в конечном итоге лимитирует накопление максимально возможного количества клеток и продуктов их жизнедеятельности.

Чтобы увеличить скорость роста микроорганизмов, необходимо поддерживать постоянные условия среды, чему способствует метод непрерывного культивирования или проточный метод.

Метод непрерывного культивирования микроорганизмов в последнее время привлекает к себе большое внимание главным образом тем, что открывает новые возможности для микробиологической промышленности.

Впервые метод непрерывного культивирования экспериментально был осуществлен русским ученым С.В. Лебедевым в 1909 году. Он провел непрерывное спиртовое брожение на мелассе в батарее из нескольких аппаратов. Основные положения сравнительной характеристики периодического и непрерывного способов брожения нашли отражение в его работе «Методы непрерывного спиртового брожения».

Утенков М.Д. в своей работе «Микрогенерирование» изложил систему методик непрерывного выращивания бактерий в жидкой среде в аэробных и анаэробных условиях (такое культивирование называют глубинным).

Дальнейшее развитие теория непрерывного культивирования получила в 50-х годах XX столетия в работах русских и зарубежных ученых.

Основой метода непрерывного культивирования является выращивание микроорганизмов в ферментере, в который непрерывно с определенной скоростью поступает питательная среда и из которого с такой же скоростью вытекает культуральная жидкость вместе с клетками. Благодаря интенсивному перемешиванию создаются гомогенные условия.

Непрерывность процесса создается благодаря подвижному равновесию между приростом микробной биомассы и уменьшением ее за счет разбавления культуры свежей питательной средой. При условии снабжения свежим субстратом и вывода продуктов метаболизма возможно поддерживать культуру в состоянии максимального размножения.

Размножение микроорганизмов и биосинтез фермента регулируют при использовании непрерывного культивирования по мере поступления питательной смеси в ферментер. Такой ферментер представляет собой вращающийся трубнообразный реактор, через один конец которого в него поступает питательная среда и культура микроорганизмов, а из другого — выводятся ферменты, продукты жизнедеятельности и бактериальная масса. Основное достоинство метода — возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизма. Например, культура ацетонобутиловых бактерий находилась в таком реакторе в состоянии непрерывного размножения в течение 200 суток.

Для непрерывного культивирования микроорганизмов применяют различные системы, которые классифицированы Гербером:

- гомогенно-непрерывные системы. К ним относятся хемостат Новика и Сциларда, бактоген Моно и турбидостат Брайсона;
- гетерогенно-непрерывные системы. Типичный пример такой системы – трубчатый реактор, через который протекает однородная струя среды.

При сопоставлении методов периодического и непрерывного культивирования становится очевидным, что последний создает уникальную возможность, изменяя скорость роста, оставлять постоянными остальные параметры условий наращивания культуры.

Кроме того, одним из важнейших преимуществ метода непрерывного культивирования является более высокая продуктивность по сравнению с периодическим культивированием при одних и тех же габаритах оборудования. Другим, не менее важным преимуществом является возможность автоматического регулирования процесса. По существу непрерывное культивирование – процесс саморегулирующийся и простота регулирования подобной системы неоднократно подчеркивалась различными авторами. Для автоматизации непрерывного процесса, достаточно относительно, простое регулирование условий: скорости потока, давления, температуры, активной кислотности, внесения определенных компонентов.

Самым основным преимуществом непрерывного культивирования, считают биотехнологи и микробиологи, является установившийся режим, что позволяет стабилизировать культуру в определенном физиологическом состоянии.

Теория образования биомассы хорошо разработана, процесс описывается математически и поддается управлению, что весьма удобно в производственных условиях.

Важнейшим фактором эффективности технологии ферментных препаратов является качество питательной среды. Основное требование к качеству питательной среды состоит в полноценности ее состава, обеспечивающей рост продуцента и биосинтез целевого фермента. Микроорганизмы нуждаются прежде всего в соединениях, содержащих углерод, азот, водород и кислород. К ним относятся органические вещества, соли аммония и вода. Кроме того, в состав питательной среды должны быть включены минеральные соединения, содержащие Mg, Ca, P, S, Fe, K и другие макро- и микроэлементы, витамины, ро-

стовые вещества (биотин, инозит) и пр. Питательные среды в зависимости от состава делятся на синтетические и комплексные. Синтетическими считают те, которые состоят из определенного по качественному и количественному составу набора индивидуальных веществ. В комплексные среды входят различные природные продукты, часто отходы пищевых производств. К их числу относятся различные жмыхи, барда спиртовых заводов, картофельная мезга, кукурузный экстракт, меласса, отруби и прочие продукты. Благодаря использованию отходов комплексные питательные среды доступны, дешевы и обеспечивают безотходность биотехнологических производств.

Выделение и очистка фермента как из культуры микроорганизма (выращенного любым способом), так и из других природных источников очень трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому, если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают. В промышленности широко применяют коммерческие препараты ферментов, чистота которых составляет всего 0,1 % (т. е. 99,9 % составляют примеси). К таким отраслям относятся спиртовая, кожевенная, текстильная промышленность, а также сельское хозяйство, производство бытовой химии. Например, ферментный препарат, употребляемый в пивоварении, представляет собой высушенную биомассу плесневых грибов. В большинстве отраслей пищевой промышленности, практике научных исследований и особенно в медицине ветеринарной медицине используют только очищенные препараты ферментов, частично или полностью освобожденные от балластных веществ и полностью охарактеризованные в отношении их специфичности и физико-химических свойств. Исходным материалом для получения препаратов ферментов служат: биомасса продуцента, фильтрат культуральной жидкости, экстракт из культуры микроорганизма или из тканей и органов растений и животных, из которых готовят препараты различной степени очистки.

Неочищенные ферментные препараты получают путем высушивания в мягком режиме культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды. Такие препараты получают и путем упаривания экстракта из культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости (в случае глубинного выращивания микроорганизмов). Распространен так же метод ацетоновых порошков, состоящий в осаждении и быстром обезвоживании при температуре не выше -10°C тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты. Технические препараты ферментов представляют собой либо высушенные до порошкообразного состояния продукты, либо жидкие концентраты, обычно характеризующиеся 50 %-ным содержанием сухой массы веществ.

Для успешного выделения ферментов из клеточного содержимого необходимо очень тонкое измельчение исходного материала вплоть до разрушения субклеточных структур: лизосом, митохондрий, ядер и др., которые имеют в своем составе многие индивидуальные ферменты. Для этого используют специальные мельницы и гомогенизаторы, а также ультразвук, метод попеременного замораживания и оттаивания ткани. Для высвобождения ферментов из мембранных структур клетки к гомогенатам добавляют небольшие количества де-

терогентов (твин, тритон X-100) или обрабатывают их энзимами – лизоцимом, целлюлазой, лецитиназой С. При выделении ферментов особенно важно проводить все операции при условиях, исключающих денатурацию белка (нейтральное значение рН, стабилизирующие добавки в виде белков, солей и специальных соединений).

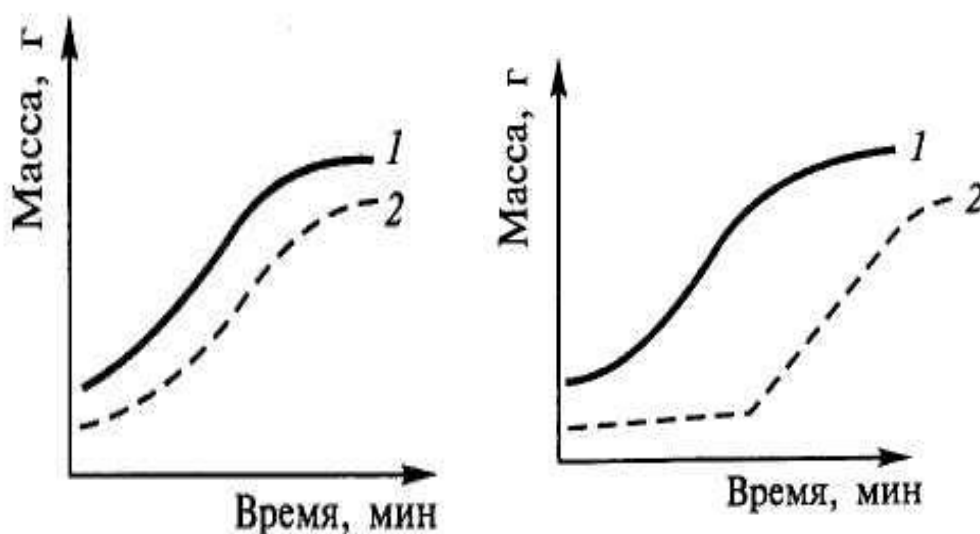
3.2 Биотехнология производства метаболитов

Продуктов, образующихся методами биотехнологии довольно много. Целевыми продуктами биотехнологических производств могут быть интактные клетки. Одноклеточные организмы используют для получения биомассы, являющейся источником кормового белка. Клетки, особенно в иммобилизованном состоянии, выступают в роли биологических катализаторов для процессов биотрансформации.

Процессами биотрансформации называют реакции превращения исходных органических соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов или ферментов, выделенных из них. В последние годы высокая специфичность процессов биотрансформации и эффективность иммобилизованных ферментов нашли широкое применение для крупномасштабного производства аминокислот, антибиотиков, стероидов и других промышленно важных продуктов.

Продуктами биотехнологических производств являются природные макромолекулы, образующиеся в процессе жизнедеятельности животной растительной или микробической клетки — белки, ферменты, полисахариды, полиэферы (поли- β -гидроксibuтират).

По отношению к процессу роста продукты метаболизма живых клеток делятся на первичные и вторичные метаболиты (рисунок 3).



1 – биомасса; 2 – продукт

Рисунок 3 Динамика изменения биомассы и образования первичных (а) и вторичных (б) метаболитов в процессе роста организма

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 1500 Да), которые необходимы для роста клеток. Они участвуют в создании макромолекул. К ним относятся структурные единицы биополимеров — аминокислоты, нуклеотиды, моносахариды, а также витамины, коферменты, органические кислоты и другие соединения.

Вторичные метаболиты - это высокомолекулярные соединения, не требующиеся для выживания клеток и образующиеся по завершении фазы их роста (антибиотики, пигменты, гормоны роста, токсины).

Центральное звено биотехнологического процесса — живая клетка, в которой одновременно синтезируется великое множество разнообразных соединений. Нормальный обмен веществ в клетке осуществляется по принципам строжайшей экономии, что обеспечивается сложнейшей системой регуляции всех процессов. Задача биотехнолога состоит в обеспечении сверхсинтеза одного из продуктов метаболизма, что достигается как путем изменения генетической программы организма, так и посредством нарушения регуляторных систем метаболизма в нем.

Ферменты сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток, поэтому их традиционно широко применяют в практике. Биологические катализаторы нетоксичны, работают в мягких условиях, используют доступное сырье (в том числе и отходы), в связи с чем их применение в промышленности выгодно с экономической и экологической точек зрения.

По объему производства ферменты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков. Из более чем 2000 известных в настоящее время ферментов в промышленности используется около 30. Основная часть ферментов, поступающих на мировой рынок, приходится на долю гидролаз, из которых 60 % составляют пептидогидролазы (в основном щелочные и нейтральные протеазы), используемые в качестве детергентов в производстве синтетических моющих средств, а 30 % — гликозидазы, применяющиеся в производстве кондитерских изделий, фруктовых и овощных соков. Ферменты находят применение в текстильной, кожевенной, целлюлозо-бумажной, медицинской, химической промышленности.

По прогнозам ученых, основным потребителем ферментов в ближайшем будущем остается пищевая промышленность. Главное место среди этих энзимов занимают глюкоизомераза и глюкоамилаза, применяющиеся для приготовления обогащенных фруктозой кукурузных сиропов и составляющие около 50 % рынка пищевых энзиматических препаратов.

Все большее развитие получают технологические процессы с участием сложных энзиматических систем, включающих коферменты. Так, созданы ферментные мембранные реакторы, катализирующие непрерывные процессы с регенерацией НАДН (восстановительное аминирование кетокислот, восстановление α -кетокислот в α -гидроксикислоты). Разработаны системы разделения рацематов посредством стереоспецифического активного транспорта. Например, мембрана, содержащая гексокиназу и фосфатазу, функционирует как насос, избирательно прокачивающий лишь D-глюкозу. Применение сопряженных ферментативных реакций с участием алкогольоксидазы и каталазы дрожжей *Hansenula polymorpha* и формальдегиддисмутазы бактерии *Pseudomonas putida* позволило осуществить окисление метанола в муравьиную кислоту с выходом 88—94 %. В промышленности большое будущее имеют ферменты, способные катализировать химические реакции в органической фазе, в частности липазы.

Существенно, что каталитическая активность панкреатической липазы свиньи сохраняется при концентрации воды в реакционной среде, составляющей всего 0,015 %, и при температуре 100 °С. Препараты липазы используют для синтеза оптически чистых сложных эфиров и феромонов, применяющихся в парфюмерии и медицине.

Для деградации и модификации антропогенных органических соединений, поступающих в окружающую среду, используют ферменты разных классов и в том числе лактазу, лигниназу, тирозиназу, монооксигеназу, диоксигеназу и др. Перспективна для очистки сточных вод новая технология, основанная на использовании реакции пластеинообразования, открытой А. Я. Данилевским в 1886 г. Сущность работ Данилевского состоит в экспериментальном доказательстве обращения протеолиза и возможности синтеза белковоподобных веществ (пластеинов) под действием ряда протеолитических ферментов. Сточные воды содержат аминокислоты и пептиды, концентрация которых возрастает в результате гидролиза белковых компонентов отходов под воздействием пептидогидролаз микроорганизмов. Данная технология, активно внедряющаяся во Франции, нацелена на производство в промышленных масштабах кормовых белков из аминокислот и пептидов сточных вод.

Ферменты широко используют в медицине, например в заместительной терапии в составе лечебных препаратов. Пероральное введение фенилаланин-аммиаклиазы снижает уровень фенилаланина в крови при фенилкетонурии. Протеолитические ферменты, амилазу и липазу применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени. В последние годы накопились данные об эффективности применения протеиназ в энзимотерапии злокачественных новообразований. Это объясняется большей проницаемостью мембран раковых клеток для гидролитических ферментов в сравнении с нормальными клетками, благодаря чему опухолевые клетки быстро лизируются при введении смеси протеиназ (препарат «папайотин»). Протеолитические ферменты — плазмин и активирующие его стрептокиназу и урокиназу используют для растворения тромбов в кровеносных сосудах; коллагеназу — для рассасывания рубцовых образований; эластазу — для задержки развития атеросклероза; лизоцим — для лечения конъюнктивитов; дезоксирибонуклеазу из стрептококка (стрептодорназа) — для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и роговицы глаза.

Важнейшую область применения ферментов в медицине составляет энзимодиагностика — тестирование патологии того или иного органа человека по уровню активности фермента или соотношению его множественных форм и изоферментов. Так, аспартатаминотрансфераза, изоцитратдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и альдолаза служат для выявления инфаркта миокарда; аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза и лактатдегидрогеназа — для диагностики заболеваний печени; глутамилтрансфераза — для блокировки отторжения органов при их пересадке и т.д.

Таким образом, производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к тем ее отраслям, объем продукции которых постоянно растет, а сфера применения неуклонно

расширяется. По объему производства ферментов доминируют страны Западной Европы. Резкий рост этой индустрии наблюдается в США и Японии.

Лабораторная работа № 4 **Определение свертывающей силы сычужного фермента**

Цель работы. Освоить методы оценки свертывающей силы сычужного фермента.

Задачи. Провести оценку свертывающей силы сычужного фермента, рассчитать дозу внесения фермента с учетом его активности.

Под свертывающей силой фермента, понимают количество частей молока, которое свертывается одной частью сычужного фермента в течение 40 минут при температуре 35 °С. Сычужный порошок обладает силой 1:100 000, пепсин – 1:50 000.

Порошок сычужного фермента готовят на специализированных заводах из сычугов телят и ягнят. Телят убивают в возрасте 2-4 недель, а ягнят – в первые дни жизни (смушковое овцеводство). Из поступивших на завод высушенных сычугов по специальной технологии извлекают фермент, высушивают и рассылают на сыродельные заводы в виде порошков стандартной активности, равной 100000 единиц. Один грамм такого порошка свертывает 100000 г молока при температуре 35°С в течение 40 минут. Количество фермента в одном сычуге теленка достаточно для свертывания 2-3 т молока, а ферментом одного сычуга ягненка можно свернуть до 200 кг молока.

В условиях хозяйства раствор сычужного фермента можно получить непосредственно из сычугов телят, ягнят, для чего из убитых животных извлекают сычуги, удаляют содержимое, отверстие одного конца сычуга (со стороны книжки) завязывают шпагатом, а через другое с помощью трубки надувают воздухом, после чего завязывают и это отверстие. Надутые сычуги подвешивают для сушки в темном, сухом помещении без сквозняков. Сухие сычуги по несколько штук заворачивают в темную бумагу, подвешивают в сухом помещении и хранят в таком виде до использования.

Раствор сычужного фермента из сычугов готовят следующим образом. Обрезают концы высушенного сычуга. Затем складывают их так, чтобы узкий конец одного сычуга находился на широком конце другого, после этого их измельчают. Измельченный сычуг помещают в эмалированную или фарфоровую посуду, заливают 5% раствором поваренной соли из расчета 250 см³ на 10 г сычуга. При температуре 30-35 °С выдерживают сычуги в рассоле в течение 4-6 часов, и вносят кислую сыворотку 1 литр на 10 грамм сычуга, настаивают в течение 2-3 суток при температуре 35-38°С. Далее раствор процеживают через марлю и отжимают жидкость. Если раствор хороший, то частицы сычуга не всплывают на поверхность. Сычужный фермент из сычуга переходит в раствор, который используют так же как и раствор сычужного фермента, приготовленный из порошка заводского производства.

При свертывании молока казеин переходит из коллоидного состояния в гель (студенистое). Сущность воздействия сычужного фермента на молоко еще окончательно не установлена. Важное значение для свертывания имеют кислотность молока, температура свертывания и другие факторы. Поэтому перед началом использования фермента определяют крепость сычужного раствора, чтобы рассчитать его потребность для перерабатываемого молока.

Приборы. Прибор для определения свертывания молока.

Материалы и реактивы. Молоко, порошок и раствор сычужного фермента.

Установление количества сычужного фермента. Количество сычужного фермента, необходимого для свертывания молока, определяют специальным прибором. Он представляет собой металлическую кружку, емкостью 1 л. На ее внутренней стенке расположена шкала с делениями от 0,5 до 5, на дне имеется отверстие, через которое молоко, занимающее деление от верхнего (нулевого) до нижнего (пятого) деления вытекает в течение 4 мин.

Для приготовления раствора сычужного фермента берут 2,5 г порошка сычужного фермента, смешивают с 2,5 г поваренной соли и растворяют в 95 см³ при температуре 35°С. Через 8-10 минут делают пробу, определяя крепость раствора.

Крепость раствора – это время, выраженное в секундах, в течение которого 100 см³ молока свертываются под действием 10 см³ раствора сычужного фермента.

Крепость раствора определяют после подготовки молока и при той же температуре, при которой будет происходить образование сгустка. Для этого в ковш отмеряют мензуркой 100 см³ молока, помешивая, быстро вносят 10 см³ раствора фермента. Останавливают движение молока и отмечают время по секундомеру. Затем наблюдают за образованием сгустка. Сгусток считается готовым, если с поверхности наклоненного ковша он сползает не оставляя следов белка.

Ход работы. Кружку с молоком и с закрытым отверстием устанавливают на углу ванны так, чтобы молоко из отверстия вытекало в ванну. Когда уровень молока в приборе будет на уровне нулевого деления, в молоко вносят 10 см³ приготовленного раствора сычужного фермента и быстро перемешивают шпателем. В момент образования сгустка вытекание молока из прибора прекращается. Отмечают деление шкалы, на котором установился уровень молока. Это деление показывает, какое количество сычужного фермента (г) необходимо для свертывания 100 килограмм молока за 30 минут.

Если продолжительность свертывания молока будет другой, количество сычужного фермента рассчитывают по формуле:

$$29) \Phi = 30 \bullet \Pi / В ,$$

где Φ – количество сычужного фермента для свертывания 100 кг молока, г; П – показатель шкалы кружки; В – желаемая продолжительность свертывания, мин.

Из молока можно получить сгусток за любой промежуток времени. Но оптимальная продолжительность его свертывания считается 25-30 мин.

Затем делают расчет потребности в ферменте для всего молока, предназначенного для изготовления сыра.

Потребность в сычужном растворе для всего перерабатываемого молока определяют по формуле:

$$30) \Phi = M \cdot K \cdot 0,1 / B \cdot 60 \quad ,$$

где Φ – количество раствора сычужного фермента, л; М – количество молока для свертывания, л; К – крепость раствора сычужного фермента, с; В – заданное время свертывания молока, мин.

Приготовление реактивов:

1. Рабочий раствор сычужного фермента с массовой долей 0,03% для проведения сычужной пробы.

Сначала готовят стандартный (основной) раствор. Для этого в коническую колбу вместимостью 100 см³ вносят 3,00±0,01 г сычужного порошка активностью 100 тыс. единиц и 50 см³ дистиллированной воды температурой 20±1°С, содержимое перемешивают до полного растворения порошка. В эту же колбу вносят 50 см³ глицерина. Раствор тщательно перемешивают и хранят в холодильнике в посуде из темного стекла в течение 15-30 дней при необходимости.

Рабочий раствор готовят непосредственно перед анализом. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 1 см³ стандартного раствора, доливают дистиллированной водой температурой 20±1°С до метки и тщательно перемешивают.

2. Рабочий раствор сычужного фермента с массовой долей 0,5 % для проведения сычужно-броидильной пробы.

Рабочий раствор готовят непосредственно перед анализом. Для этого в коническую колбу вместимостью 100 см³ вносят 0,50±0,01 г сычужного порошка активностью 100 тыс. единиц и добавляют 100 см³ дистиллированной воды с температурой 20±1°С. Далее содержимое колбы тщательно перемешивают до полного растворения порошка.

По результатам работы заполнить таблицу 8:

Таблица 8 - Результаты исследований

Наименование образца	Φ , г	П	К, с
1			

Контрольные вопросы:

1. Значение сычужного фермента в молочной промышленности.
2. Что такое свертывающая сила сычужного фермента?
3. Способы получения сычужного фермента.
4. Что такое крепость раствора сычужного фермента?
5. Опишите методику и сформулируйте сущность определения количества сычужного фермента.

4. ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Биологическая ценность пищевых продуктов повышается в том числе и благодаря применению бифидобактерий. Продукты содержащие молочнокислые и бифидобактерии обеспечивают организм пластическими и энергетическими веществами. При разработки технологий использования бифидобактерий в производстве пищевых продуктов учитывается невысокая кислотообразующая активность бифидобактерий, поэтому их применяют совместно с молочнокислыми бактериями.

Снижение рН необходимо для процессов затвердевания колбасного фарша. При рН близких к 5,2-5,3 происходит набухание коллагена, гидролиз межмолекулярных связей, активация тканевых ферментов, увеличивается водосвязывающая способность мяса, ускоряется редукция нитрата в нитрит и образование в присутствии нитрита метмиоглобина и нитрозомиоглобина, обеспечивающих стабильную окраску мяса. Быстрое снижение рН фарша ниже 5,4 подавляет развитие в нем патогенной и токсикогенной микрофлоры, что нашло широкое применение в производстве сырокопченых колбас.

Микроскопические грибы продуцируют специфические ферменты, которые оказывают влияние на ход созревания сырокопченых колбасных изделий. Продуцируемые ими протеолитические ферменты и амилазы участвуют в формировании особого аромата сырокопченых колбас. В основном применяются чистые культуры грибов или смеси из двух видов. В промышленности используют суспензию спор с минимальным количеством клеток 10^6 в 1 см^3 суспензии. Суспензией обрабатывается оболочка сырокопченых колбас (инокуляция), после чего создаются оптимальные климатические условия для прорастания грибов в центр колбасного батона. Так же например штамм дрожжей *Debaryomyces hansenii* применяется для биологической защиты поверхности колбасных батонов.

4.1 Пищевая, биологическая и энергетическая ценности

Существующие термины пищевой, энергетической, биологической ценности отражают полезность пищевых продуктов в зависимости от их химического состава и основываются на особенности метаболических превращений отдельных пищевых веществ в организме человека.

Термин «пищевая ценность» является наиболее общим термином. Он отражает совокупность полезных качеств продукта, связанных с оценкой содержания в нем широкого перечня веществ.

В понятие «пищевая ценность» входят количественное соотношение пищевых веществ в продукте, суммарная энергетическая ценность, органолептические характеристики продукта и способность веществ перевариваться и усваиваться организмом (рисунок 4).

Понятие «биологическая ценность» является более частным и отражает качество пищевых веществ, связанных с их перевариваемостью, а для белков – и со степенью сбалансированности аминокислотного состава.

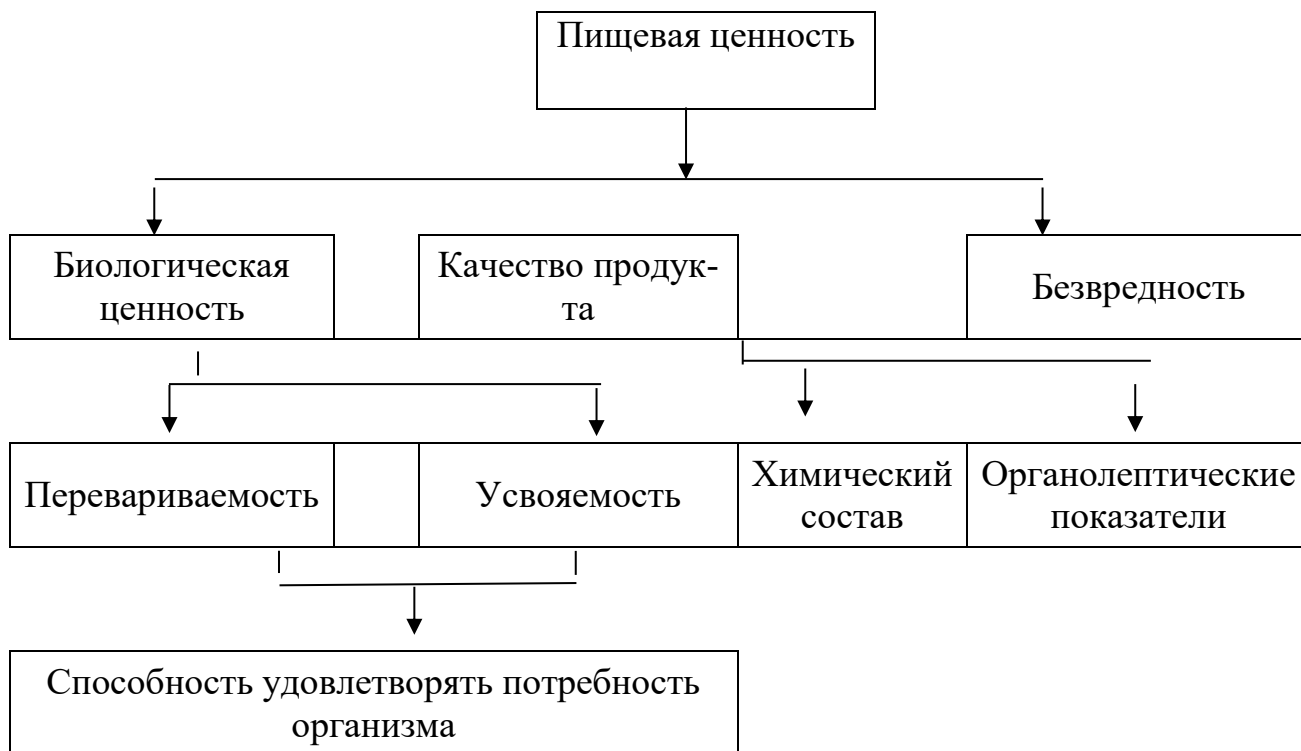


Рисунок 4 - Показатели пищевой ценности.

Термин «энергетическая ценность» определяет количество энергии, которая высвобождается из пищевых веществ в процессе биологического окисления и используется для обеспечения физиологических функций организма.

Энергия образуется в результате окисления содержащихся в клетках углеводов, жиров, белков и в небольшой степени других соединений – кислот, этилового спирта и т.д. Поэтому важно знать количество расходуемой в сутки организмом человека энергии, чтобы своевременно восстанавливать ее запасы. Измеряется количество энергии в тепловых единицах: в ккал или кДж (1 ккал соответствует 4,186 кДж).

Вещества, необходимые организму человека для получения энергии, поступают с пищей. Наряду с этим пищевые вещества используются организмом для обновления составных частей клеток, тканей и органов, для роста и увеличения массы тела. Поэтому пища должна обеспечивать оптимальные условия для жизни человека и его работоспособности. Необходимая энергетическая ценность пищи для людей разного пола, возраста, массы, рода деятельности колеблется от 2850 до 20875 кДж/сут. В зависимости от вида продукта и его состава пища имеет различную энергоёмкость – от 147,5 до 1662,5 кДж на 100 г продукта.

Зная уровень усвоения питательных веществ в организме (белок — 84,5 %, жир — 94 %, углеводы — 95,65 %) и величину теплоты сгорания компонентов пищи, можно рассчитать энергетическую ценность продукта.

Если знать общий химический состав и массу продукта, а также энергетическую ценность пищевых веществ, можно рассчитать пищевую ценность продуктов в энергетическом выражении.

Питательные вещества продуктов питания также являются источником биологически необходимых, незаменимых веществ. С этой стороны важными являются показатели биологической ценности белка отраженные на рисунке 5. Понятие «биологическая ценность» (БЦ) характеризует качество белкового компонента продукта, обусловленное как степенью сбалансированности состава аминокислот, так и уровнем переваримости и ассимиляции белка в организме.

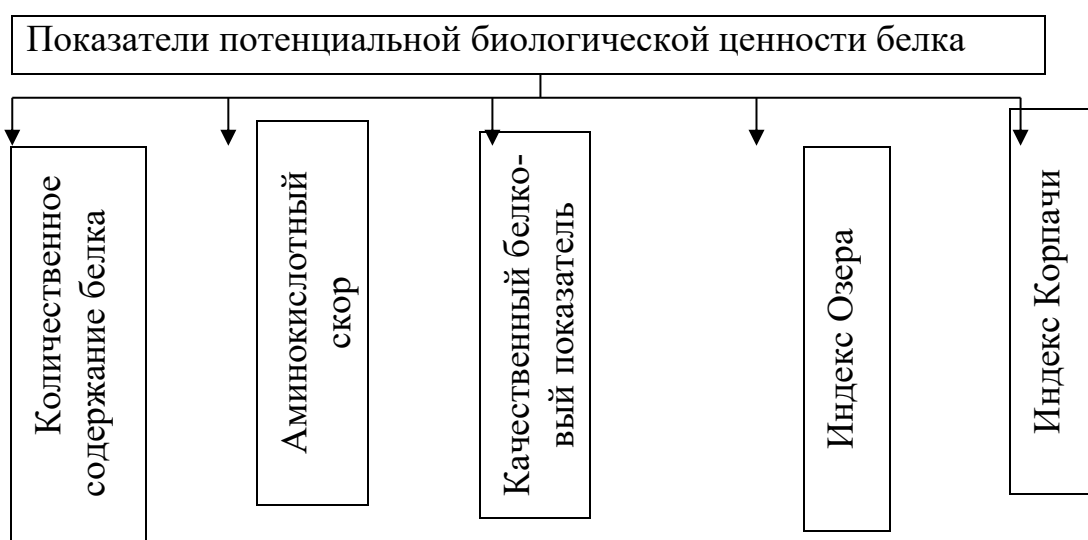


Рисунок 5 - Критерии оценки потенциальной биологической ценности белка.

В среднем взрослый человек в течение суток должен получать с пищей 1—1,2 г белка на 1 кг массы тела. Однако он нуждается не просто в белке, а в белке определенного состава. Белки, содержащиеся в различных продуктах, неравноценны. Из 20 аминокислот 8 являются незаменимыми, в отличие от остальных они не синтезируются в организме. По этой причине 30 % суточного белкового рациона человека должны составлять полноценные белки, то есть белки, содержащие все незаменимые аминокислоты. Интересно, что годовая потребность человека в полноценном белке составляет 20 кг.

Если в рацион человека входит несколько взаимообогащающих неполноценных белков, то они должны поступать в организм одновременно и в определенном соотношении. В организме не происходит накопления аминокислот, а синтез белка возможен лишь при наличии всех незаменимых аминокислот в заданной количественной пропорции. Главным признаком полноценных белков является наличие в составе их молекул радикалов незаменимых аминокислот (валина, лейцина, изолейцина, триптофана, метионина, лизина, фенилаланина, треонина), естественно вместе с прочими аминокислотами. Четыре аминокислоты (тирозин, цистеин, аргинин и гистидин) считают условно незаменимыми. Медиками установлено, что дефицит незаменимых аминокислот в питании может привести к нарушению здоровья человека.

На основе многолетних медико-биологических исследований ФАО /ВОЗ (1973 г.) был предложен критерий для определения качества белка — эталон, сбалансированный по незаменимым аминокислотам согласно данным таблицы 9 и в наибольшей степени отвечающий потребностям организма. Часто за эталон принимают белки молоко или яйца.

Сравнивая результаты определения количества незаменимых аминокислот в исследуемом продукте с данными эталона или идеального белка можно расчетным путем определить индекс биологической ценности продукта или, другими словами, *аминокислотный скор*. В отношении мясных изделий расчет сгора ведут либо для всех незаменимых аминокислот, либо для трех наиболее дефицитных: лизина, триптофана и суммы серосодержащих (метионин + цистин).

Таблица 9 - Эталон определения качества белка, сбалансированный по незаменимым аминокислотам, г/100 г белка

Аминокислота	Вид белка				
	куриное яйцо	молоко		эталон ФАО/ВОЗ	
		женское	коровье	для взрослых	для детей 2-5 лет
Изолейцин	6,9	6,4	6,4	4,2	2,8
Лейцин	9,4	8,9	9,9	7,0	6,6
Валин	7,4	6,6	6,9	4,8	3,5
Фенилаланин	5,8	4,6	4,9	7,3	6,3
Тирозин	4,1	5,5	5,1	7,3	6,3
Цистин	2,3	2,1	0,9	2,6	2,5
Метионин	3,3	2,2	2,4	2,6	2,5
Треонин	5,0	4,6	4,6	3,5	3,4
Триптофан	1,6	1,6	1,4	1,1	1,1
Лизин	6,9	6,3	7,8	5,1	5,8

Дефицит незаменимых аминокислот зависит и от качественного состава самого сырья (например, белок крови содержит мало метионина и изолейцина), и от степени воздействия на белок различных внешних факторов. При жестких режимах термообработки и щелочного гидролиза некоторые аминокислоты могут разрушаться.

Помимо аминокислотного сгора можно применять и другие методы расчета потенциальной биологической ценности белка (индекс Озера, индекс Корпачи, показатель Митчелла и др.), но более простым и распространенным является метод расчета величины качественного показателя белка (КПБ). Качественный белковый показатель – это отношение количества триптофана к оксипролину. Этим методом можно установить соотношение мышечных и соединительнотканых белков.

Аминокислотный состав и аналитический расчет показателей биологической ценности дают представление лишь о потенциальной ценности белкового

компонента, но так как организм человека использует не все, что поступает в него с пищей, а только то, что после переваривания в пищеварительном тракте всасывается через стенки кишечника в кровь.

Вторым компонентом, количественно преобладающим в составе мяса, является жир, представленный в основном триглицеридами. Биологическая роль триглицеридов состоит в том, что они являются источниками энергии, а также содержат несинтезируемые в организме человека высокожирные полиненасыщенные кислоты и жирорастворимые витамины, роль которых в физиологии весьма велика.

В суточном потреблении взрослого человека (80—100 г, в том числе 20—25 г растительных жиров) должно содержаться 2—6 г полиненасыщенных жирных кислот, 35 г олеиновой кислоты и 20 г насыщенных жирных кислот. Соотношение между количеством полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот должно составлять 0,3:0,35.

Определение уровня биологической ценности липидов можно произвести расчетным путем, сопоставляя потребное количество каждого из незаменимых компонентов в формуле сбалансированного питания с его содержанием в продукте.

При определении биологической ценности жиров большое значение имеет наличие и количественное содержание «триады» так называемых незаменимых жирных кислот. Подобно незаменимым аминокислотам они синтезируются ограниченно или не синтезируются в животных организмах совсем.

Количественное соотношение белков и жиров в составе продукта влияет на усвояемость тех и других компонентов. При повышенном содержании жира тормозится отделение желудочного сока, замедляется переваривание белков пепсином и трипсином, изменяется обмен некоторых веществ, подавляются система свертывания крови и процесс ассимиляции витаминов. Установлено, что оптимальным соотношением жира и белка в пищевых продуктах является 1(0,8): 1,0. Определенное соотношение белка и жира в мясе играет значительную роль в формировании биологической ценности мясопродуктов и позволяет с научной точки зрения подойти к вопросам рационального использования сырья и обоснованного создания рецептур и технологий.

Химическая оценка биологической ценности белков важна и необходима, но пассивна, так как отражает лишь потенциальную возможность белка в удовлетворении потребностей человека и животных. Результат зависит от особенностей структуры белка и атакуемости его со стороны пищеварительных протеиназ (пепсина, химотрипсина, трипсина и др.).

Под действием пищеварительных ферментов белковые вещества расщепляются на отдельные фрагменты (аминокислоты и пептиды), они проникают через стенку кишечника и ассимилируются организмом.

Биоактивность – это способность продукта стимулировать процессы внутреннего обмена веществ, секреторную функцию. Таким образом, зависимость между биологической ценностью белков и их аминокислотным составом справедлива лишь при условии достаточно высоких скоростей переваривания ферментами пищеварительного тракта, усвояемости компонентов и их биоак-

тивности. В связи с этим перечисленные показатели являются составными частями биологической оценки пищевых продуктов. Биологическая доступность белка и степень его усвоения зависят от ряда факторов. Например, они обусловлены природой белка и его структурой: (белки соединительной ткани расщепляются хуже, чем мышечные; нативные — хуже, чем денатурированные). Изменение физической структуры мяса (степени дисперсности за счет измельчения) и биохимической структуры белка (денатурация) повышает доступность компонентов действию пищеварительных ферментов. При взаимодействии белковых частиц друг с другом или с молекулами некоторых других веществ происходит образование надмолекулярных белковых структур, что понижает биологическую доступность белков.

Скорость переваривания белков отдельными ферментами желудочно-кишечного тракта важна при разработке рационов питания для здорового и особенно для больного человека, а также при определении пищевой ценности отдельных продуктов.

Определение степени расщепления и усвояемости белкового компонента мяса производят двумя методами: в опытах «in vitro» и «in vivo». В опытах «in vitro» в системах пепсин — трипсин либо с использованием реснитчатой инфузории *Tetrachylena periformis* моделируют процесс переваривания белков в желудочно-кишечном тракте. Но достоверные сведения о биологической ценности белкового компонента и продукта можно лишь на основе опытов, проводимых на животных, и наблюдений за человеком, определяя степень фактической утилизации пищевых веществ в организме в процессе обмена веществ по характеру адсорбции белка и изменению ростовесовых показателей. На практике используют: коэффициент эффективности белка (КЭБ), биологическую ценность (БЦ), истинную переваримость (ИП), коэффициент использования белка (КИБ).

Истинная перевариваемость (ИП) характеризует способность белка распадаться под действием протеолитических ферментов пищеварительного тракта и всасываться через слизистую оболочку кишечника.

Биологическая ценность (БЦ) учитывает ту часть азота, которая фактически используется, и зависит преимущественно от сбалансированности изучаемых белков по аминокислотному составу и от одновременности введения этих метаболитов в кровеносную систему.

Коэффициент использования белка (КИБ) — это отношение связанного азота к азоту, поглощенному с пищей, т. е. суммарная оценка, принимаемая в расчет при оценке биологической ценности и переваримости.

Коэффициент эффективности белка (КЭБ) — отношение прироста массы к потребленному белку.

Биологические методы базируются на принципе азотного баланса в процессе жизнедеятельности организма. Поступивший в организм азот расходуется по двум направлениям. Первый после всасывания в пищеварительном тракте поступает в кровеносную систему (перевариваемый азот), удерживается организмом или катаболизируется (используется как источник энергии) и выделяется с мочой, а второй — выбрасывается с фекалиями. Постоянное новообразование белков в организме из имеющихся происходит с потерей азота, которая не

зависит от пищевого азота (эндокринный азот мочи). Исходя из азотных фракций, можно установить различные соотношения, позволяющие характеризовать превращения белков в организме.

Различия в усвояемости влияют на утилизацию белков, в связи с чем при расчете безопасных уровней потребления обычных смесей пищевых белков вводят поправки на усвояемость. Поскольку оценки безопасных уровней потребления основаны на данных, полученных при использовании белков молока, яиц, мяса и рыбы, усвояемость других белков выражают через усвояемость белков вышеперечисленных продуктов.

В таблице 10 представлены данные усвояемости белков некоторых пищевых продуктов человеком.

Таблица 10 - Усвояемость белков некоторых пищевых продуктов человеком, (%)

Источник белка	Истинная усвояемость	Усвояемость относительно эталонных белков
Яйца	97±3	100
Молоко, сыр	95±3	100
Мясо, рыба	94±3	100
Кукуруза	85±6	89
Рис полированный	88±4	93
Пшеница цельная	86±5	90
Пшеница очищенная	96±4	101
Мука овсяная	86±7	90
Мука соевая	86±7	90
Просо	97	83
Горох зеленый	88	93
Масло арахисовое	95	100
Бобы	78	82
Кукуруза+бобы	78	82
Кукуруза+бобы+молоко	84	88

Биологические методы оценки усвояемости белков достаточно объективны, но дороги в исполнении, а также требуют длительного времени и большого количества материалов для анализа. В этой связи химические методы имеют существенные преимущества. Наиболее известны подходы, основанные на определении аминокислотного состава, когда выделяют лимитирующие аминокислоты, а затем их сравнивают со стандартным белком. При этом подсчитывают сумму лимитирующих аминокислот и выражают ее в процентах от суммы всех аминокислот либо сравнивают соотношение незаменимых аминокислот с тем же показателем в «идеальном» белке. При этом, безусловно, учитывают соотношение всех незаменимых аминокислот.

В последнее время стали очень популярны ферментативные методы, поскольку они позволяют искусственно создать условия, максимально приближенные к

условиям живого организма. Например, переваримость белков *in vitro* широко используется в аналитической практике.

Для определения соответствия аминокислотного состава белков потребностям человека предложен ряд индексов, каждый из которых дает лишь ограниченную оценку. Из них особое внимание заслуживает отношение суммы незаменимых аминокислот Н (мг) к общему содержанию белкового азота О (г). Чем ниже величина Н/О, тем выше содержание неспецифического азота. Для белков молока и яиц отношение Н/О составляет 3,1—3,25, для мяса — 2,79—2,94, для пшеницы — 2.

Более полное представление о биологической ценности белков дает показатель *аминокислотного сора*. Лимитирующей является та незаменимая аминокислота, у которой показатель аминокислотного сора в том или ином белке является наименьшим.

Показатель аминокислотного сора устанавливает предел использования азота данного вида белка для пластических целей. Избыток других содержащихся в белке аминокислот может использоваться как источник для неспецифического азота или для энергетических нужд организма.

Количество углеводов в созревшем мясе составляет около 1,0—1,5 %. Их роль в основном связана с участием в биохимических процессах созревания мяса, формирования вкуса, аромата, изменения консистенции, величины рН, нежности и т. д., т. е. углеводы опосредованно влияют на качество мясных изделий и их биологическую ценность.

Полная характеристика критериев оценки пищевой ценности продуктов представлена на рисунке 6.

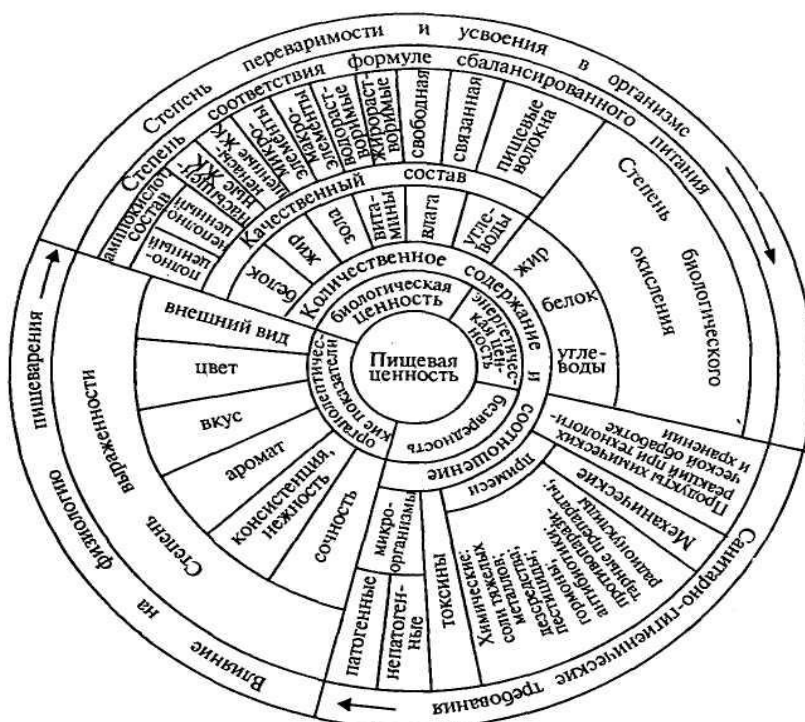


Рисунок 6 - Показатели пищевой ценности продуктов питания.

В соответствии с теорией адекватного питания часть балластных веществ пищи (клетчатка, пектин и др.), которые относят к пищевым волокнам, выполняют весьма важную физиологическую функцию. Благодаря специфическим функциональным свойствам пищевые волокна активно участвуют в регуляции биохимических процессов в органах пищеварения и выведении из организма токсических веществ, поступающих с водой, пищей и воздухом. Пищевые волокна могут использоваться для профилактики ряда заболеваний, в первую очередь таких, как атеросклероз, сахарный диабет, ожирение, ишемическая болезнь сердца, заболевания толстой кишки и др. В связи с необходимостью создания специальных продуктов питания вопрос применения балластных веществ типа пшеничных отрубей, яблочного пектина, целлюлозы, метилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы приобретает важное значение. Необходимо отметить, что функции пищевых волокон, кроме указанных веществ растительного происхождения, выполняют и соединительнотканые белки тканей животных.

Витамины, микро- и макроэлементы, а также вещества, стимулирующие секреторно-моторную деятельность пищеварительного тракта (экстрактивные вещества, ферменты), являются необходимой составной частью мяса, и поступление их с пищей — необходимое условие для нормального развития и функционирования организма.

В состав сырого мяса входит полный набор водорастворимых (B_1 , B_2 , PP, B_6 , пантотеновая кислота, биотин, фолиевая кислота, B_{12} , C) и жирорастворимых (A, D, E, K, F) витаминов, регулирующих рост и физиологические процессы. Однако при тепловой обработке часть витаминов теряется, а оставшееся количество не удовлетворяет потребностям организма. Недостающая часть витаминов обычно компенсируется высоким их содержанием в других компонентах рациона питания или путем целенаправленного обогащения мясных продуктов этими компонентами (витаминизацией).

Минеральные вещества мышечной ткани (соединения калия, натрия, магния, железа, цинка) участвуют во многих обменных процессах и в образовании буферных систем, влияют на степень растворимости и набухания белков, и, следовательно, наличие их также имеет значение при определении пищевой ценности продукта, причем наибольший интерес представляет содержание натрия, кальция и железа.

Азотистые экстрактивные и другие органические вещества участвуют в создании специфического аромата и вкуса мяса, способствуют улучшению органолептических показателей и тем самым стимулируют секреторную функцию пищеварительного аппарата. Влияние органолептических характеристик на пищевую ценность продукта состоит в том, что, воздействуя на органы чувств человека, они возбуждают аппетит и улучшают секреторно-моторную деятельность пищеварительного тракта. Это во многом определяет покупательский спрос. Реакция человека на продукт зависит от внешнего вида, цвета, вкуса, запаха, консистенции (нежности) и сочности готового изделия, при этом результаты органолептической оценки зачастую бывают решающими при определе-

нии качества продукции, особенно новых видов. Органолептические показатели меняются в зависимости от природы продукта, его химического состава, степени биохимических изменений (например, созревания мяса), условий технологической обработки (измельчение, посол, варка, копчение и т. д.), использования специй, пищевых и вкусовых добавок.

Структурно-механические свойства (консистенция, жесткость, механическая прочность), обусловленные пространственным распределением белков, липидов и воды в продукте, формой и прочностью связей между ними, определяют органолептические показатели, характер и степень разрушения продукта в процессе разжевывания. В то же время этот фактор обеспечивает удельную поверхность контакта и физическую доступность частиц пищевых веществ действию ферментов, т. е. переваримость.

Лабораторная работа №5 **Расчет пищевой, биологической и энергетической ценности** **пищевых продуктов**

Цель работы. Освоить методы определения энергетической и биологической ценности молока, молочных продуктов, мяса и мясных продуктов расчетным путем.

Задачи. Рассчитать скор незаменимых аминокислот в молоке, молочных продуктах, мясе, мясных или комбинированных продуктах; выявить лимитирующие аминокислоты, оценить среднюю величину избытка скор незаменимых аминокислот и рассчитать коэффициент утилитарности и показатель «сопоставимой избыточности».

Определение показателей энергетической ценности **продуктов расчетным методом**

Методика определения. Метод заключается в расчете энергетической ценности продукта, зная его химический состав и энергетическую ценность отдельных пищевых веществ.

Приборы. Микрокалькулятор.

Материалы и реактивы. Справочные данные состава мясных и молочных продуктов.

Методика определения. В качестве исходных для расчетов используют данные из справочной литературы.

Выполнение работы. Основными поставщиками энергии в молоке являются жиры, белки, лактоза.

Энергетическая ценность (в ккал/г) некоторых пищевых веществ составляет:

Жиры.....	9,0
Белки.....	4,0
Моно- и дисахариды.....	3,8

Для расчета пользуются следующей формулой:

$$31) \text{ Э} = 9 X_1 + 4X_2 + 3,8 X_3,$$

где Э - энергетическая ценность продукта питания, ккал;

X1 - массовая доля жира в продукте, г;

X2 - массовая доля белка в продукте, г;

X3 - массовая доля углеводов в продукте, г.

Например, энергетическая ценность 100 г молока, содержащего 3,2% жира, 3,0% белков и 4,5% лактозы, составит

$$3,2 \cdot 9 + 3 \cdot 4 + 4,5 \cdot 3,8 = 57,9 \approx 58 \text{ ккал}$$

Следовательно, в нашем примере энергетическая ценность 100 г молока будет равна 58 ккал, а 1 кг – 580 ккал.

Порядок оформления работы

1. Получить индивидуальное задание.
2. Выполнить расчет энергетической ценности продукта и свести полученные данные в таблицу 11.

Таблица 11 - Результаты исследований

Продукт	Жир, %	Белок, %	Углеводы, %	Энергетическая ценность, ккал/кг
ИТОГО:				

Определение показателей биологической ценности расчетным методом

Принцип метода. Биологическая ценность продуктов питания характеризуется аминокислотным скором.

Скор – это процентное содержание каждой из аминокислот продукта по отношению к их содержанию в идеальном белке.

За идеальный белок, полностью удовлетворяющий потребность организма, комитетом ФАО/ВОЗ рекомендована условная аминокислотная шкала (в мг на 1 г белка): изолейцина – 40, лейцина – 70, лизина – 55, метионина+цистина – 35, фенилаланина+тирозина – 60, триптофана – 10, треонина – 40, валина – 50.

Для выражения биологической ценности продуктов используют метод, основанный на сравнении аминокислотного состава заданного продукта с «идеальным» белком по аминокислотной шкале, рекомендованной комитетом ФАО/ВОЗ. Для расчета аминокислотного сора определяют массовую долю каждой незаменимой аминокислоты в конкретном продукте и соотносят ее с соответствующей аминокислотой в «идеальном» белке. Аминокислотный скор выражается в процентах.

Лимитирующей биологическую ценность продукта является аминокислота, скор которой имеет меньшее значение. Наиболее ценные для человека - серосодержащие аминокислоты: метионин, участвующий в кроветворении, а также

образовании холина и фосфолипидов; триптофан - в синтезе тканей; лизин - в кроветворении и процессах обмена веществ в организме.

Последовательность определения. Для расчета аминокислотного сора сопоставляют содержание каждой незаменимой аминокислоты в исследуемом продукте с ее содержанием в «идеальном белке»:

$$32) A = \frac{X1}{X2} \cdot 100,$$

где А – аминокислотный скор, %;

X1 – массовая доля незаменимой аминокислоты в исследуемом продукте, мг на 1 г белка;

X2 – массовая доля незаменимой аминокислоты в «идеальном» белке, мг на 1 г белка.

Порядок оформления работы. Получив задание, определить биологическую ценность белков молока и мяса, если содержание незаменимых аминокислот в белках молока и мяса указаны в таблицах 12 и 13.

Используя данные аминокислотного состава, студенты расчетным путем определяют показатели биологической ценности продуктов. Для сопоставления результатов расчет рекомендуется вести по нескольким объектам.

Таблица 12 - Содержание незаменимых аминокислот в белке молока

Незаменимые аминокислоты	Массовая доля, %				
	казеина	лакто-глобулина	лакто-альбумина	иммуно-глобулина	альбумина сыворотки крови
Валин	7,2	5,8	4,7	9,6	12,3
Изолейцин	6,1	6,8	6,8	3,1	2,6
Лейцин	9,2	15,1	11,5	9,1	12,3
Лизин	8,2	11,7	11,5	7,2	6,3
Метионин	2,3	3,2	1,0	1,1	0,8
Треонин	4,9	5,2	5,5	10,1	5,8
Триптофан	1,7	1,3	7,0	2,7	0,7
Цистеин+цистин	0,34	3,4	6,4	3,0	6,0
Фенилаланин	5,0	3,5	4,5	3,8	6,6

Таблица 13- Состав незаменимых аминокислот в некоторых видах мяса мясных продуктах, г на 100 г белка

Продукт	Валин	Изо-лейцин	Лейцин	Лизин	Метионин	Треонин	Триптофан	Фенилаланин
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Говядина (мышечная ткань)	5,3	4,3	7,5	8,0	2,7	4,0	1,2	4,1
Свинина (мышечная ткань)	5,5	4,7	7,5	7,9	2,3	4,7	1,3	3,9
Конина I категории	5,1	4,0	7,6	8,9	2,4	4,7	1,4	4,3
Куры I категории	4,8	3,8	7,7	8,7	2,5	4,8	1,6	4,0
Печень говяжья	5,6	5,3	9,0	5,1	2,9	4,8	1,6	5,7
Почки говяжьи	5,5	2,9	6,8	8,3	1,5	1,8	1,3	3,8
Рубец говяжий	3,8	3,4	6,0	5,0	1,6	3,5	0,9	3,4
Селезенка говяжья	4,7	7,4	6,1	9,4	2,4	3,3	1,4	2,5
Колбаса вареная докторская	5,2	4,2	7,1	7,3	2,7	4,1	1,1	3,9
Колбаса полукопченая минская	6,9	4,9	7,2	7,2	2,7	3,5	1,0	2,9
Колбаса сырокопченая сервелат	5,5	4,5	7,6	8,4	3,0	4,2	1,5	3,9
Яйцо куриное целое	6,0	4,7	8,5	7,1	3,3	4,8	1,6	5,1
Желатин пищевой	2,0	1,3	2,7	4,3	0,1	1,4	0,1	1,7

Аминокислотный скор

Выписывают данные о содержании незаменимых аминокислот в исследуемых мясных продуктах и рекомендации ФАО/ВОЗ применительно к «идеальному» (стандартному) белку. Аминокислотный скор определяют по формуле:

$$a = \frac{A K_{\text{пр}}}{A K_{\text{ст}}} \cdot 100$$

где AK — содержание незаменимой аминокислоты в 1 г исследуемого белка, мг;

AK_n — содержание той же аминокислоты в 1 г «идеального», (стандартного) белка, мг;

100 — коэффициент пересчета в проценты.

Лимитирующей биологическую ценность аминокислотой считается та, скор которой наименьший.

Коэффициент различия аминокислотного сора (КРАС, %). Показывает среднюю величину избытка аминокислотного сора незаменимых аминокислот по сравнению с наименьшим уровнем сора какой-либо незаменимой ами-

нокислоты (избыточное количество незаменимых аминокислот, не используемых на пластические нужды):

$$\text{КРАС} = \frac{\sum \Delta \text{РАС}}{n}$$

где $\Delta \text{РАС}$ — различие аминокислотного сора аминокислоты;

$$\Delta \text{РАС} = C_i + C_{\min}$$

здесь C_i —избыток сора аминокислоты;

C_{\min} — минимальный из скоров незаменимых аминокислот исследуемого белка по отношению к эталону, %;

n — количество незаменимых аминокислот.

Биологическую ценность (БЦ) пищевого белка (%) определяют по формуле:

$$\text{БЦ} = 100 - \text{КРАС}$$

Коэффициент утилитарности аминокислотного состава имеет практическое значение, так как возможность утилизации аминокислот организмом предопределена минимальным скором одной из них.

Коэффициент утилитарности j -й незаменимой аминокислоты (доли единицы) рассчитывают по формуле:

$$a_j = C_{\min} / C_j$$

где C_j —скор j -й незаменимой аминокислоты по отношению к физиологически необходимой норме (эталону), %;

$$C_j = (A_j / A_{эj}) \cdot 100 ,$$

здесь A_j — содержание j -й незаменимой аминокислоты в продукте, г/100 г белка;

$A_{эj}$ —содержание j -й незаменимой аминокислоты, соответствующее физиологически необходимой норме (эталону), г/100 г белка.

Коэффициент утилитарности j -й незаменимой аминокислоты используют для расчета коэффициента утилитарности аминокислотного состава (U), который является численной характеристикой, достаточно полно отражающей сбалансированность незаменимых аминокислот по отношению к эталону:

$$U = \frac{\sum_{j=1}^k (A_j a_j)}{\sum_{j=1}^k A_j}$$

Меньшая возможность утилизации незаменимых аминокислот в составе белка пищевого продукта организмами наблюдается тогда, когда их скоры максимальны или наиболее близки к максимуму.

Общее количество незаменимых аминокислот в белке оцениваемого продукта, которое из-за взаимнесбалансированности по отношению к эталону не может быть утилизировано организмом, служит для оценки сбалансированности состава незаменимых аминокислот по показателю сопоставимой избыточности (σ), который определяется по формуле:

$$\sigma_c = \sigma_n / \sigma_{\min}$$

$$\sigma_n = (A_j - C_{\min} A_{эj})$$

По рассчитанному аминокислотному скору определить аминокислоту, лимитирующую биологическую ценность продукта. Лимитирующая аминокислота имеет наименьшее значение скоры. Сформулировать вывод о проделанной работе.

Результат расчетов оформляют в виде таблицы 14 следующей формы:

Таблица 14 - Результаты исследований

Аминокислота	Содержание, мг				Скор, %	КРАС, %	БЦ, %	U	σ_c
	В стандартном белке		В исследуемом образце						
	на 1г белка	на 1г азота	на 1г белка	на 1г азота					
Изолейцин	40	50							
Лейцин	70	440							
Лизин	55	340							
Метионин + цистеин	35	220							
Фенилаланин + тирозин	60	380							
Треонин	40	250							
Триптофан	10	60							
Валин	50	310							
В с е г о	360	2250							

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение “пищевой ценности” продукта питания.
2. Что необходимо знать для расчета энергетической ценности молока?
3. Дайте определение биологической ценности продукта питания.
4. Что такое аминокислотный скор и как он определяется?

5. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Достижения генной инженерии одно два десятилетие назад казались фантастикой. Но воплощения ее результатов в жизнь, а вернее, в практическую деятельность человека превзошли ожидания ученых. Результаты использования генно-инженерных методов в медицине, сельском хозяйстве и в пищевой промышленности показали и доказали огромные возможности улучшения, преобразования и создания новых объектов человеческой деятельности. Они также открыли больше перспектив для реализации этой деятельности человека. Молодая область научных изысканий создала мощный фундамент для развития многих отраслей народного хозяйства.

Однако общепринятого определения генетической инженерии пока не существует. Приведем некоторые из них.

Одни авторы дают определение: генетическая инженерия - это совокупность методов для получения рекомбинантных ДНК.

Рекомбинантными ДНК, согласно определению Национального института здоровья США, называются молекулы ДНК, полученные вне живой клетки, в пробирке, путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке.

Другие считают: генетическая инженерия - один из разделов молекулярной генетики, связанной с целенаправленным созданием в условиях «in vitro» новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке хозяина и синтезировать конечные продукты обмена.

Третьи предлагают: генетическая инженерия - искусство использования знаний, методов и техники физико-химической биологии и молекулярной генетики для конструирования организмов с заданными наследственными свойствами.

Первоначально к генетической инженерии относили работы только с отдельными молекулами ДНК или генами. В настоящее время понятие «генетическая инженерия» расширено и в ней выделено два раздела: генная инженерия и геномная инженерия.

Генная инженерия (или трансгеноз) методами «in vivo» и «in vitro» решает задачи введения в геном реципиентной клетки одного или нескольких чужеродных генов либо создания в геноме новых типов регуляторных связей. При этом видовая принадлежность реципиентных организмов не меняется, но появляются не свойственные им признаки.

Геномная инженерия связана со всей генетической программой организма, и перед ней стоят задачи более глубокого вмешательства в геном, вплоть до создания новых видов организмов. Генетическим материалом живых организмов являются нуклеиновые кислоты - ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота).

Генетическая инженерия возникла на стыке многих биологических дисциплин: молекулярной генетики, энзимологии, биохимии нуклеиновых кислот, и др.

Первая рекомбинантная молекула ДНК была получена в 1972 году американским биохимиком Пом Бергом с сотрудниками. Она была составлена из фрагмента ДНК обезьяньего вируса ОВ40 и бактериофага λ dvgal с галактозным опероном E. Coli. Формально именно 1972 год считают датой рождения генетической инженерии. Основные этапы развития генной инженерии как науки отражены в таблице 15.

ДНК находится в ядре клетки (у эукариот) или ядерной зоне (у прокариот) и цитоплазматической мембране. Если клетки имеют плазмиды, то ДНК располагается и в цитоплазме клетки.

Плазмиды - это внехромосомные, внеядерные молекулы ДНК, способные к самостоятельной репликации и передающиеся в дочерние клетки при делении бактерии.

При размножении происходит репликация – удвоение молекул ДНК. Двойная цепь ее сначала разделяется на две, и на каждой из образовавшейся цепей под действием фермента ДНК - полимеразы достраиваются новые комплементарные (недостающие) дочерние цепи нуклеотидов.

В каждой нити ДНК закодирована генетическая (наследственная) информация. Отдельные участки молекулы ДНК представляют собой функциональные генетические единицы - гены, которые являются основным материальным элементом наследственности.

Гены входят в состав хромосом и контролируют определенную ступень обмена веществ в организме и оказывают специфическое действие на развитие одного или нескольких признаков, т.е. обладают элементарной биохимической функцией, например, определяют структуру одного фермента.

Таблица - 15 Основные этапы развития генетической инженерии

Год	Автор	Содержание открытия
1	2	3
1869	Ф. Мишер (Швейцария)	Выделена ДНК из ядер клеток гноя
1953	Д. Уотсон, Ф. Крик (США)	Сконструирована модель двойной спирали ДНК на основании результатов рентгеноструктурного анализа ДНК
1961	А. Мармур и П. Доти	Открыто явление ренатурации ДНК и установлены точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот
1962	В. Арбер (Швейцария)	Впервые получены сведения о ферментах рестрикции ДНК
1968	М. Мезельсон и Е. Юань	Выделена первая рестриктаза
1966	М. Ниренберг, С. Очоа, Г. Корана (США)	Расшифрован генетический код
1967	М. Геллерт	Открыта ДНК-лигаза

1	2	3
1972-1973	Г. Бойер, С. Коэн, П. Берг (Стенфордский университет и Калифорнийский университет в Сан-Франциско)	Разработана технология клонирования ДНК
1975-1977	Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам, В. Гилберт (США)	Разработаны методы быстрого определения нуклеотидной последовательности
1979	Г. Корана (США)	Синтезирован ген тирозиновой супрессорной РНК
1981-1982	Р. Пальмитер, Р. Бринстер, А. Спреэдлинг, Г. Рубин	Получена трансгенная мышь. Получены трансгенные экземпляры дрозофилы
1993	Л.К. Эрнст, Г. Брем, И.В. Прокофьев (Россия)	Получены трансгенные овцы с геном химозина

Хромосомами называют элементы клеточного ядра, состоящие из ДНК и белков. Они являются основными носителями наследственной информации организма.

Гены подразделяются на структурные, гены-регуляторы и гены-операторы. Различают также модификаторные гены, самостоятельно не проявляющиеся и активизирующиеся под действием регуляторных генов.

Наиболее важными являются структурные гены, в которых кодируется информация о первичной структуре контролируемого геном белка, т.е. о последовательности расположения аминокислот, входящих в состав белка. Эта же последовательность определяет и пространственную структуру белка, так называемую конформацию.

Полный набор генов, которым обладает клетка, представляет собой генотип, определяющий развитие признаков и свойств организма в целом.

Кодирование белков не единственная функция ДНК, и для того чтобы узнать, какова общая организация последовательностей ДНК, и каким образом отдельные гены — функциональные единицы ДНК — взаимодействуют друг с другом в геноме организма необходимо гены отделить. Для этого надо «разрезать» ДНК не в случайных, а в строго определенных местах, с точностью до одного нуклеотида. Возможность решить эту проблему появилась благодаря развитию химии и энзимологии.

С помощью генной инженерии можно повысить продуктивность растений и животных их устойчивость к стрессовым факторам, к патогенам, вредителям. В микробиологии генная инженерия позволяет создавать штаммы с высокой продуктивностью биологически активных веществ (витаминов, ферментов). Например применение в молочной промышленности микроорганизмов с повышенной β -галактозидазной активностью позволит получать продукты лечебно-профилактического назначения для людей с непереносимостью лактозы.

Повышенная продуктивность полисахаридов у молочнокислых микроорганизмов позволит получать десерты без применения структурообразователей и загустителей.

5.1 Инженерная энзимология, её задачи

Развитие прикладной энзимологии долгое время сдерживалось дороговизной чистых ферментных препаратов, неустойчивостью их при хранении и невозможностью многократного использования. Принципиально новые перспективы открылись перед прикладной энзимологией в 60-е годы XX в. в результате появления на стыке химии и биологии новой отрасли — инженерной энзимологии. Ее задачи заключаются в развитии прогрессивных методов выделения ферментов, их стабилизации и иммобилизации; конструировании катализаторов с нужными свойствами и разработке научных основ их применения.

В частности, методами белковой инженерии, сущность которых состоит в изменении первичной структуры природной молекулы фермента посредством химической модификации самого энзима или его гена, удастся принципиально трансформировать структуру активного центра и его функцию, модулировать субстратную специфичность и физико-химические свойства фермента. Так, замена остатка глутамина-102 в молекуле лактатдегидрогеназы на аргинин превратила фермент в высокоактивную малатдегидрогеназу. Описанным способом получены термостабильные формы лизоцима Т-4 и субтилизина (каталитическая константа субтилизина изменена в 100 раз), созданы гибридные формы ферментной системы, ценной в иммуноферментном анализе, сочетающие в себе свойства β -галактозидазы и β -галактокиназы.

Многие проблемы технологии синтеза органических соединений, пищевой и медицинской промышленности, мониторинга человека и окружающей среды, защиты окружающей среды, энергетики не могут быть решены без использования методов современной инженерной энзимологии.

Важным этапом развития инженерной энзимологии стала разработка способов получения и использования иммобилизованных ферментов.

5.2 Генная инженерия растений

Генно-инженерные методы, в частности технология рекомбинантных ДНК, позволяют создавать новые генотипы и, а значит, новые формы растений гораздо быстрее, чем классические методы селекции. Кроме того, появляется возможность целенаправленного изменения генотипа — трансформации — благодаря введению определенных генов.

Проблемы выращивания сельскохозяйственных растений связаны с перспективой ввода в них генов устойчивости к стрессовым факторам, фитопатогенам, гербицидам и пестицидам, генов скороспелости, а также с расширением круга культурных растений, способных к симбиотической фиксации азота и т.д.

Сущность генетической трансформации состоит в переносе чужеродных или модифицированных генов в эукариотические клетки. Можно также вводить

гены и в клетки прокариот, но этот перенос осуществляется не для трансформации, а в целях увеличения экспрессии чужеродных генов, их клонирования. В клетках растений также возможна экспрессия генов, перенесенных как от других растений, так и от микроорганизмов или от животных. Получение растений с новыми свойствами из трансформированных клеток (регенерация) возможно благодаря их свойству тотипотентности, т.е. способности развиваться в целое растение из одной живой клетки.

Однако возможности и генной инженерии растений имеют ограничения по ряду причин. Во-первых, геном растений изучен хуже, чем геном млекопитающих. Это означает, что определение и выделение искомым генов — задача достаточно затруднительная. Во-вторых, не для всех растений удастся подобрать условия регенерации. Стабильно получают растения-регенераты из протопластов картофеля, люцерны, томатов, моркови, табака, капусты и др. Регенерацию злаков из их клеток пока не всегда удастся воспроизвести. В-третьих, одна из главных лимитирующих причин — размер гетерологичной ДНК (не более 35 кб для агробактериальной и немного больше для баллистической трансформации), которую можно было бы эффективно вводить в геном растения. Не так давно была сделана удачная попытка использовать при трансформации пыльцу в качестве супервектора, что позволяет исключить появление химерных растений (В.А.Аветисов, Ю.В. Давыдова и др., 1999). Имеются сообщения об использовании искусственной бактериальной хромосомы в качестве вектора для трансформации, которая позволяет переносить значительные фрагменты ДНК, вводить кассеты генов, кодирующие множественные ступени биохимических процессов. Это открывает такие огромные перспективы, что первостепенными становятся вопросы экологической безопасности.

Биотехнология и, в частности, генная инженерия в настоящее время результатами своей деятельности поднимают ряд этических вопросов и проблем, и заставляют думать о возможных последствиях эксперимента, об использовании полученных знаний.

5.2.1 Получение трансгенных растений

Перенос генов в растительные клетки, так же как в клетки животных, и их встраивание в геном растений (трансформация) осуществляются в большинстве случаев с помощью специфических структур — векторов.

5.2.1.1 Векторы, их применение, требования к ним

Молекулы ДНК, способные принимать чужеродную ДНК и обеспечивающие удвоение, и экспрессию, называются векторными молекулами. Векторные молекулы — это ковалентно закрытые кольцевые молекулы ДНК, содержащие репликатор (ori-последовательности). Векторы позволяют вводить в клетку дополнительную генетическую информацию. В качестве векторов используют, плазмиды, бактериофаги, мобильные элементы, вирусы животных. К векторной молекуле предъявляются ряд требований:

- 1) она должна иметь область, чувствительную к определенной эндонуклеазе рестрикции, которая расщепляет вектор в одном участке, превращая его кольцевую форму в линейную. К линейной ДНК «пришивают» ген или гены и затем снова замыкают ее в кольцо и рекомбинантную ДНК вводят в клетки;
- 2) При помощи вектора можно умножать гены (т.е. ДНК). Чтобы ген экспресировался (получался продукт, синтезированный по информации введенного гена), вектор должен содержать специфические для данной клетки промоторы и терминаторы («стоп»-кодона) транскрипции;
- 3) в составе векторной молекулы должен быть маркерный ген, который после проникновения вектора в клетку придает ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора. Часто в качестве селективных используют гены ферментов, которые ингибируют действие антибиотиков.

5.2.1.2 Векторы на основе Ti-плазмид

Некоторые виды агробактерий (*Agrobacteria*) могут заражать двудольные растения, вызывая образование опухолей — корончатых галлов. Одним из самых сильных индукторов опухолей служит почвенная бактерия *A. tumefaciens*. Способность этой бактерии к образованию опухоли связана с большой внехромосомной плазмидой, получившей название Ti-плазида (от англ. tumor inducing — индуцирующие опухоль).

Ti-плазмиды — это естественные векторы для генов, обладающие всеми функциями, необходимыми для переноса, стабильного включения и экспрессии генетической информации в растениях. Они имеют широкий круг хозяев. В бактериальных клетках Ti-плазмиды реплицируются автономно. Эти плазмиды различаются по типу кодируемых опинов — белков, которые используются бактериями в качестве источников азота и углерода. Обычно встречаются плазмиды, кодирующие два типа опинов: либо октопин (октопиновая плазида), либо нопалин (нопалиновая плазида).

После заражения часть Ti-плазмиды встречается в хромосомах клеток растения-хозяина. Таким образом, *A. tumefaciens* встраивает часть своего генома в ДНК растительной клетки и заставляет ее изменять метаболизм, синтезируя вещества, необходимые для бактерий. Именно это свойство *A. tumefaciens* послужило поводом для создания на основе Ti-плазмиды вектора, доставляющего необходимые гены в клетку.

Участок Ti-плазмиды, встречающийся в хромосомах растительных клеток, называется T-областью в бактерии и T-ДНК в клетках растений. T-область включает примерно 10 % Ti-плазмиды и содержит гены, отвечающие за индукцию опухоли, синтез опинов и подавление дифференцировки (гормоннезависимый рост клеток). При этом важно, что все гены, ответственные за перенос и интеграцию генов T-области, находятся не в ней самой, а рядом — в области вирулентности — vir-области (рисунок 7).

T-области ограничены прямыми повторяющимися последовательностями, и любая ДНК, вставленная между этими повторами, будет принята за T-область и перенесена в растительную клетку.

Недостаток этих плазмид состоит в том, что некоторые гены, находящиеся в Т-ДНК, заставляют расти клетки растений независимо от гормонов, вносимых в питательную среду, на которой культивируются данные клетки. В связи с этим очень трудно регенерировать нормальное растение из клеток, содержащих полную последовательность Т-ДНК. Еще один недостаток — большие размеры Тi-плазмиды, из-за которых затруднены какие-либо манипуляции с ней, поэтому вставить ген в плазмиду традиционными методами невозможно.

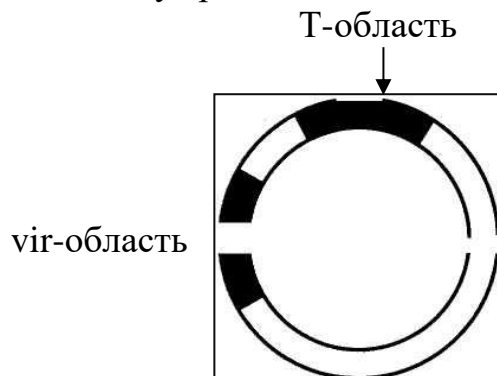


Рисунок 7 - Взаимное расположение Т- и vir-областей в Тi-плазмиде

В настоящее время конструируются производные Тi-плазмиды, в которых оставляют регуляторный участок Т-области, а вместо ее структурных генов вшивают структурную часть гена, который надо ввести в растение. Такие гены с точки зрения их регенерации безвредны для растений.

Существуют и другие бактерии (*A. rhizogenes*), вызывающие усиленное образование корешков при заражении растений. За этот процесс ответственны содержащиеся в них так называемые Ri-плазмиды (от англ. root inducing — индуцирующий корни). Ri-плазмиды выгодно отличаются от Тi-плазмид тем, что они служат естественными безвредными векторами, так как трансформированные с их помощью растительные клетки сохраняют способность к морфогенезу и к регенерации здоровых растений. В связи с этим Ri-плазмиды в данный момент рассматриваются как более перспективные векторы.

5.2.1.3 Промежуточный и бинарный векторы

Эти векторы конструируются на основе Тi-плазмид. Промежуточный вектор получают путем ряда сложных операций. Сначала Т-область с помощью рестриктаз вырезают из плазмиды, вставляют в вектор для клонирования в клетке *E. coli* и размножают. Затем внутри Т-области встраивают чужеродный ген и вновь размножают. Полученную рекомбинантную плазмиду вводят в клетки *A. tumefaciens*, несущие полную Тi-плазмиду. В результате двойного кроссинговера между гомологичными участками Т-область рекомбинантной плазмиды, содержащая чужеродный ген, включается в Тi-плазмиду клетки хозяина, заместив в ней нормальную Т-область. Бактериями, имеющими Тi-плазмиду со встроенными генами, заражают те растения, где эти гены встраиваются в геном растительной клетки.

Бинарные векторы представляют собой бактерии, содержащие две разные T1-плазмиды. Одна из них несет *vir*-область и обеспечивает интеграцию в геном растительной клетки T-области, содержащей любые гены другой плазмиды. В этом случае двойной кроссинговер не требуется.

Растительные клетки, полученные в результате заражения бактериями, не способны к регенерации, так как у них подавлена способность к дифференцированию. Трансформированные растительные клетки смогут дифференцироваться только в том случае, если в гены, блокирующие дифференцировку, ввести мутации или вырезать их из T-ДНК.

5.2.1.4 Векторы на основе ДНК-содержащих вирусов растений

Вирусы можно представить в качестве разновидности чужеродной нуклеиновой кислоты, которая реплицируется и экспрессируется в клетках растений. Подавляющее большинство фитовирусов в качестве носителя генетической информации содержат РНК. Только 1 — 2% вирусов, инфицирующих растения, относятся к ДНК-содержащим. Именно эти вирусы удобны для использования в технологии рекомбинантных ДНК, а также в качестве векторов.

ДНК-содержащие вирусы могут включать одноцепочечную или двухцепочечную ДНК. В качестве представителей первой группы можно назвать вирус золотистой мозаики фасоли (ВЗМФ) или вирус полосатости кукурузы. Наиболее изученный представитель группы вирусов с двухцепочечной ДНК — вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК), поражающий в основном растения семейства крестоцветных.

Обычно фитовирусы реплицируются с образованием большого числа копий молекул нуклеиновых кислот — 10^6 и более молекул на зараженную клетку. При репликации вируса табачной мозаики образуется 10^7 молекул нуклеиновых кислот (РНК) на клетку. В этой связи фитовирусы являются довольно эффективными средствами для получения хорошей экспрессии родного гена. Помимо высокой копийности вирусной нуклеиновой кислоты, вирусные векторные системы имеют дополнительно ряд преимуществ: малый размер генома (возможность легкой манипуляции вирусной ДНК) а также сильные промоторы, которые обеспечивают экспрессию чужеродных генов.

Вирусы, однако, в качестве векторов обладают некоторыми недостатками:

- имеют небольшую емкость;
- патогенны;
- неспособны встраиваться в хромосомы хозяина.

Однако небольшую емкость можно увеличить посредством инфицирования вирусом (например, ВМЦК) растительные протопласты, а не клетки растений. При этом инфекция от клетки к клетке не передается, а следовательно и не надо упаковывать ДНК в вирусные частицы.

В этой связи часть вирусного генома, ответственная за упаковку в вирусные частицы, можно удалить и заместить на дополнительную чужеродную ДНК. Такой недостаток как отсутствие способности встраиваться в геном

растительной клетки можно обойти (по крайней мере, для ВМЦК) можно избежать путем специального методического приема – агроинфекции. Для этого геном ВМЦК встраивают в T-область Ti-плазмиды и в ее составе интегрируют в ядерный геном различных растений.

5.2.2 Методы прямого переноса генов в растения

Для прямого переноса генов в растительные клетки очень часто используется трансформация растительных протопластов. При обработке клеточной стенки растения ферментами (целлюлазой, пектиназой) клеточная оболочка разрушается и остается один протопласт. Разработаны методы прямой трансформации протопластов с помощью ДНК.

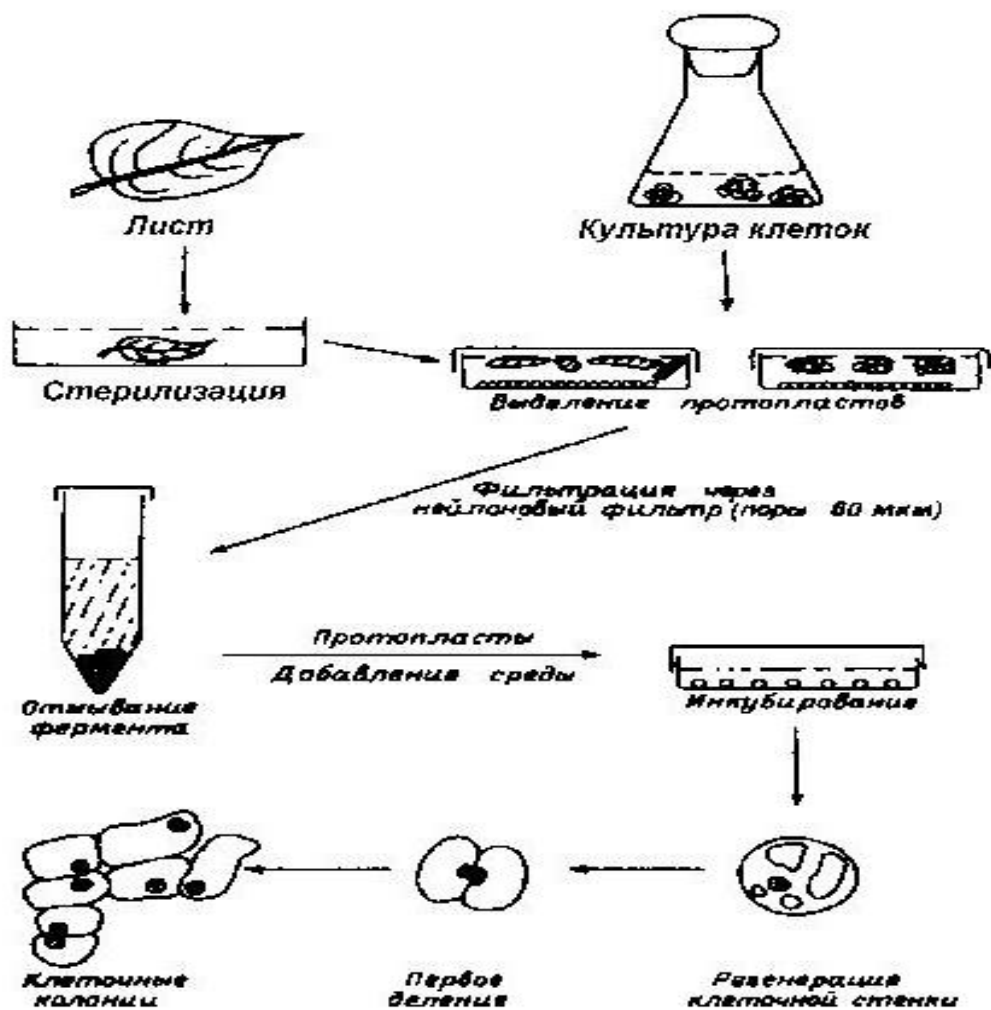
Наибольшей эффективности трансформации (10^{-2}) удалось достигнуть методом электропорации и добавления полиэтиленгликоля. Хотя частота трансформации значительно ниже, чем, например, при агробактериальной трансформации, метод прямого переноса обладает рядом преимуществ. Вектор может не содержать специальных биологических сигналов и функций трансформации (пограничных областей T-ДНК и *vir*-области).

Для трансформации может быть использован практически любой ДНК-вектор, несущий чужеродный ген. При этом, гибридный ген интегрирует в ядерную ДНК растения и экспрессируется (при наличии соответствующих регуляторных областей), особенно в случае прямой инъекции в ядро протопласта, используя механизмы клеточной рекомбинации. Однако основным недостатком такого метода является крайне низкая частота трансформации¹.

В настоящее время более 140 видов растений были протрансформированы путем прямого переноса ДНК вектора в протопластные клетки различными методами, в том числе и методами переноса генов.

В настоящее время известны несколько методов переноса генов в растение: трансформация растительных протопластов, метод кокультивации, микроинъекции ДНК, электропорация, упаковка в липосомы, биологическая боллистика. Наиболее распространенным является метод биологической боллистики.

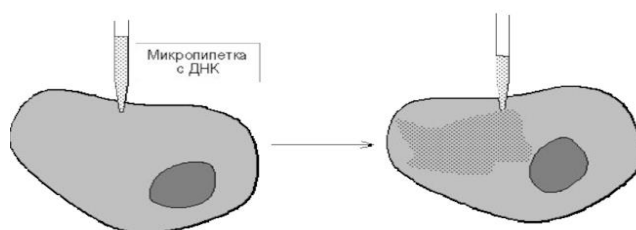
1. Трансформация растительных протопластов. Осуществление возможно благодаря комбинациям методик кальциевой преципитации ДНК и слиянию протопластов. Для этого метода может быть использован практически любой ДНК-вектор. Донорная ДНК может не содержать специальных биологических сигналов (*vir*-областей, пограничных областей T-ДНК). Клетку обрабатывают целлюлазой, образуется клетка без клеточной стенки – протопласт, с протопластом ДНК и трансформируется.



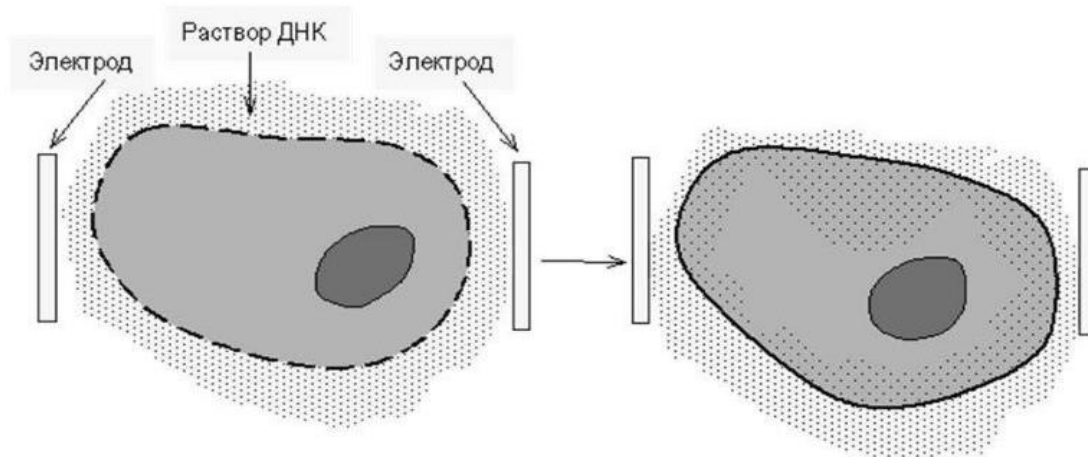
2. Метод кокультивации культуры протопластов – этот метод индукции опухолей в искусственных условиях. Сначала получают культуру протопластов, затем на начальной ее роста, когда протопласты только что регенерировали клеточную стенку и начали делиться, культуру заражают агробактериями, и потом используют в качестве векторов. При этом селективным признаком является возможность трансформированных клеток расти без добавок фитогормонов в питательную среду.

3. Микроинъекции ДНК. Для микроинъекций применяется микроигла с внешним диаметром 2 мкм и внутренним 1 — 1,25 мкм. Объем инъекций в каждый протопласт составляет $(1 — 10) \cdot 10^4 \text{ см}^3$, при концентрации — 0,1 — 1,0 мкг/мкл. Микроинъекции стали возможны после разработки метода получения протопластов для инъекций путем прикрепления их к стеклам полилизинном. Этот метод наиболее универсальный, так как трансформация не является видоспецифичной ее можно применять, когда другие способы переноса невозможны (например, агробактерии имеют ограниченный круг хозяев). Многие исследователи полагают, что микроинъекции пригодны для всех типов растений. Эффективность трансформации растительных клеток — 10 — 20% независимо от типа вектора. Трансформации не видоспецифична, возможен перенос генов в любое растение.

Микроинъекция ДНК в ткани



4. Электропорация. Метод основан на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. Для растительных протопластов электропорация очень эффективна. Метод состоит в следующем: на растительные протопласты в высоких концентрациях, находящиеся в среде электропорации, содержащей ДНК, действуют высоковольтным импульсом. В результате молекулы ДНК поглощаются клетками через поры в клеточной мембране. Далее после разведения протопласты высеваются на соответствующую среду для проращивания.



5. Упаковка в липосомы. Это один из методов используемых для защиты экзогенного генетического материала, который вводится в протопласты растений, от разрушающего действия нуклеаз. Липосомы — это сферические образования, оболочки которых состоят из фосфолипидов. Их можно получить в результате резкого встряхивания или обработки ультразвуком водных эмульсий фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фатидилсерина и холестерина, наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. К преимуществам систем переноса с помощью липосом можно отнести их низкую токсичность по отношению к клеткам и возможность их использования на множестве растений, клетки которых способны утилизировать липосомы.

6. Метод биологической баллистики. Это один из самых эффективных методов трансформации однодольных растений. Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектор, содержащий необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофа-

новую подложку и помещаются внутрь биолистической пушки. Каллус или суспензия клеток наносится на чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолистической пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток. Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации растений. С помощью биолистической пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. Исходный материал для трансформации — суспензионная культура, каллусная ткань или 4—5-дневные культивируемые незрелые зародыши однодольных.



5.2.3 Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава запасных белков растений

Решение проблемы создания новых форм растений подразумевает в первую очередь повышение качества синтезируемых растением продуктов, которые определяют его питательную и техническую ценность. В основном это касается запасных белков.

В своем большинстве запасные белки растений имеют несбалансированный для питания человека и животных аминокислотный состав. Так, запасные белки злаков — проламины — бедны лизином, триптофаном и треонином, что снижает их питательную и кормовую ценность. Улучшение аминокислотного состава белка путем традиционной селекции не дает желательных результатов, поскольку необходимые гены часто сцеплены с нежелательными признаками и наследуются вместе. Например, у мутантов кукурузы и ячменя повышение со-

держания лизина коррелировало с уменьшением синтеза основных запасных белков — зеина и гордеина, а также с уменьшением урожайности.

Генно-инженерные методы более перспективны для создания улучшенных сортов, так как позволяют избирательно вводить в геном растения-реципиента гены искомого признака. Операции по получению трансгенных растений с улучшенным аминокислотным составом белка разделены на следующие этапы:

- 1) клонирование генов запасных белков;
- 2) изучение механизмов тканеспецифичной и временной экспрессии белков и выявление последовательностей ДНК, определяющих данный механизм;
- 3) целенаправленное изменение последовательностей генов запасных белков для улучшения аминокислотного состава;
- 4) создание векторов, содержащих; измененный ген;
- 5) введение модифицированных генов в растения.

В настоящее время клонированы 10 генов гордеинов ячменя, гены α - и β -глиадинов и глютеина пшеницы, зеинов кукурузы, легумина бобовых, пататина картофеля и ряд других. Имеются практические результаты трансформации растений. Так, введение в геном пшеницы модифицированного гена проламина привело к активному синтезу модифицированного белка, а также повлияло на состав и уровень соответствующих запасных белков. В итоге улучшилось хлебопекарное качество пшеничной муки.

5.2.4 Повышение эффективности процесса фотосинтеза

Один из возможных способов увеличения фотосинтеза состоит в клонировании хлоропластных генов в клетках бактерий и их переносе в растения. Известно, что хлоропласты и прокариотические клетки похожи по ряду признаков. На основании этого А. С. Фаминцин в 1886 выдвинул гипотезу о происхождении хлоропластов. По этой гипотезе, клетки прокариот и хлоропласты сходны. В них присутствуют кольцевые ДНК, 70S-рибосомы; синтез белков начинается с одной и той же аминокислоты — N-формилметионина, а синтез белка подавляется хлорамфениколом, а не циклогексимидом, как у эукариот. Позже было доказано, что ДНК-зависимая РНК-полимераза в *E. coli* связывается с определенными участками ДНК хлоропластов шпината.

В клетках *E. coli* инициация белкового синтеза частично регулируется доступностью участка связывания рибосом (УСР). Его структура до конца еще не выяснена, но расшифрован участок, известный под названием «последовательность Шайн-Дальгарно» (ШД). Она комплементарна 3'-концу 16S-рибосомальной РНК, и инициация белкового синтеза начинается с образования комплементарной пары между этой последовательностью и 3'-концом 16S-рибосомальной РНК. Анализ последовательности ДНК хлоропластного гена большой субъединицы основного фермента фотосинтеза — рибулозодифосфат-карбоксилазы (РДФ-карбоксилазы) кукурузы — выявил значительные гомологии с известными промоторами и последовательностями ШД клеток *E. coli*. Все

это привело к попытке клонирования генов хлоропластов в клетках *E. coli*, наиболее часто используемой в генно-инженерных исследованиях.

Транскрипционные конструкции могут создаваться двумя путями: во-первых, это установка промотора рядом с УСР, который узнается полимеразой *E. coli*, во-вторых, это формирование гибридного УСР, состоящего из прокариотической последовательности ШД и эукариотического иницирующего кодона. Первый путь широко применяется для увеличения экспрессии генов *E. coli* и хлоропластных генов в клетках *E. coli*. В настоящее время уже клонировано несколько хлоропластных генов; гены синтеза субъединиц РДФкарбоксилазы, белка хлорофилл-белкового комплекса, АТФ-синтетазы, цитохрома и др.

5.2.5 Генно-инженерные подходы к решению проблемы усвоения азота

Азот — один из самых необходимых элементов для растений. Его недостаток в почве или питательном субстрате часто приводит растение к гибели, поэтому в первую очередь необходимо внесение в почву азотных удобрений. Однако их производство требует больших энергетических затрат, поэтому они дорогостоящи. Стоимость азотных удобрений в 6 раз выше стоимости фосфорных удобрений и в 16 раз выше стоимости калийных удобрений. Установлено, что растения используют от 30 до 70 % внесенных в почву доступных форм азота, остальной азот - вымывается из почвы, загрязняя окружающую среду. В этой связи снабжение растений азотом путем его биологической фиксации на взгляд ученых более естественно и доступно. Фиксация атмосферного азота (дiazотрофность) — это свойство прокариотических организмов. Азотфиксирующие организмы подразделяются на симбиотические (их 90 %) и свободноживущие (10 %). Фиксация атмосферного азота связана преимущественно с симбиотическими микроорганизмами. В настоящее время известны четыре основные системы симбиоза, имеющие большое значение не только для естественных сообществ, но и для сельского хозяйства, лесоводства. Это *Rhizobia* — бобовые растения, *Azolla-Anabaena* — рис, *Actinomyces* — деревья, *Spirillum* — травы. Атмосферный азот фиксируется благодаря уникальному ферменту — нитрогеназе.

В 1960 г. американские исследователи показали, что нитрогеназа сохраняет свою активность в бесклеточных экстрактах *Clostridium pasteurianum*. Это послужило толчком для начала активных исследований биохимии азотфиксации, структуры и механизма действия нитрогеназы. К 1981 г. нитрогеназа была выделена из 36 видов микроорганизмов. Она считается одним из наиболее сложных ферментов, использующих простые субстраты. Кроме азота нитрогеназа может восстанавливать ацетилен, цианистый водород, закись азота и некоторые другие соединения. Восстановление ацетилена в этилен позволило разработать надежный тест для обнаружения азотфиксирующей активности. Непременное условие работы нитрогеназы — ее защита от кислорода, который ингибирует не только активность нитрогеназы, но и ее биосинтез.

Начиная с 1970 г. стали появляться серьезные работы по изучению генов азотфиксации и их переносу в клетки *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli*. С помощью

техники рекомбинантных ДНК были составлены генетические карты генов азотфиксации (*nif*-генов), которые показали сходную организацию генов у большей части азотфиксирующих организмов. Было установлено, что *nif*-гены расположены между генами, кодирующими биосинтез гистидина (*his*) и генами, ответственными за усвоение шикимовой кислоты (*shiA*). Гены, кодирующие синтез белковых субъединиц компонентов нитрогеназы, образуют единый оперон. В клетках симбиотических бактерий *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii* плазмиды, кроме структурных генов нитрогеназы, содержат гены, отвечающие за развитие корневых клубеньков у определенных видов бобовых.

Конструирование плазмид, несущих *nif*-гены, позволяет передавать способность к фиксации азота организмам, не обладающим этим свойством. Среди бактерий, кроме *E.coli*, такой перенос осуществлен для бактерий *Salmonella typhimurium*, *Erwinia herbicola* и других. Однако подобные манипуляции могут приводить к нежелательным эффектам. Так, перенос генов в штамм *Erwinia* (бактерии, вызывающие гниение растений) может усилить его патогенное действие. Кроме того, существует вероятность случайного переноса вместе с *nif*-генами каких-то нежелательных генов.

В настоящее время внимание ученых привлекают проблемы введения генов азотфиксации в клетки растений; создания ризоценозов между небобовыми растениями (особенно злаками) и азотфиксирующими организмами; повышения мощности корневой системы бобовых растений для увеличения на ней количества клубеньков. Кроме того, предполагается создание новых азотфиксирующих систем путем введения азотфиксирующих микроорганизмов в каллусные ткани растений с последующим образованием на них растений-регенератов, а также повышение эффективности фиксации азота путем воздействия на гены, контролирующие этот процесс.

Наиболее интересна первая проблема – введение *nif*-генов в клетки растений. Однако ее решение сопряжено с рядом трудностей. Основная – разрушение нитрогеназы под воздействием кислорода. У азотфиксирующих микроорганизмов существует ряд приспособлений, защищающих бактерии от свободного кислорода. Среди них присутствие в клетках клубеньков леглобина – гемсодержащего белка, который встраивается в мембрану бактериоида (увеличенная в размере бактериальная клетка, характеризуется наибольшей способностью к фиксации азота) и регулирует поступление кислорода. Леглобин кодируется в геноме растительной клетки-хозяина, но его синтез начинается только после проникновения бактерий в эту клетку. У цианобактерий механизм защиты нитрогеназы от кислорода иной. Азотфиксация идет в гетероцистах, а фотосинтез – в обычных клетках. Поэтому кислород, выделяющийся в процессе фотосинтеза, не ингибирует фиксацию азота. Таким образом, введение только *nif*-генов в какую-то растительную клетку не решает проблемы. Если нитрогеназа будет синтезироваться в этой клетке, в частности в клетках злаков, то она разрушится под действием кислорода, присутствующего в клетке. Кроме того, сама клетка, в которую переносят гены азотфиксации, может быть не приспособлена к синтезу и расходованию большого количества энергии, которое требуется для фиксации азота.

Таким образом, более перспективно повышение эффективности фиксации азота в уже существующих природных системах за счет воздействия на гены, контролирующие этот процесс, а также увеличение мощности корневой системы бобовых растений и создание новых азотфиксирующих систем с помощью методов клеточной инженерии.

5.2.6 Устойчивость растений к фитопатогенам

Наибольший урон растениям наносят грибные, бактериальные и вирусные патогены. В растении существуют защитные механизмы, которые в большей или меньшей степени (в зависимости от устойчивости растений) начинают действовать в ответ на проникновение фитопатогенов в клетку. Во-первых, начинается синтез соединений, вызывающих гибель патогенов. Примером могут служить специфические белки PRP (pathogen related proteins). Из них наиболее изучены ферменты хитиназы и β -1,3-глюконазы, которые угнетают рост грибов и некоторых видов бактерий, разрушая их клеточные стенки. Во-вторых, могут создаваться структурные барьеры, препятствующие распространению инфекции. Это достигается благодаря лигнификации клеточных стенок. Той же цели – защите клеток – служит присутствие в клеточных стенках белков-экстензинов и олигосахаридов.

Применение методов генетической инженерии, использующих естественные защитные механизмы, позволяет получить трансгенные растения, устойчивые к грибной, бактериальной и вирусной инфекции. Так, гены хитиназы и глюконазы кодируются одиночными генами. Благодаря этому были получены трансгенные растения табака и турнепса, в состав генома которых ввели ген хитиназы. Лабораторные и полевые испытания выявили большую устойчивость трансгенных растений. В растения томатов был введен ген защитных пептидов редьки (дефензинов) *rs*, отвечающих за устойчивость к фитопатогенным грибам. Наконец, перспективны клонирование и перенос генов, кодирующих специфические белки (small antibiotic-like proteins), содержащиеся в семенах многих растений. Эти белки защищают семена в период покоя и во время прорастания от грибных и бактериальных инфекций.

Другой подход к получению трансгенных растений, устойчивых к вирусной инфекции, состоит во введении в геном исходных растений гена оболочки вируса. Это приводит к ингибированию размножения вируса и снижению инфицированности. Благодаря такому подходу был получен стойкий антивирусный эффект у растений табака, трансформированных геном оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ).

Еще одна группа методов получения трансгенных растений устойчивых к действию фитовирусов, включает введение и экспрессию генов антивирусных антител, вирусных сателлитных РНК. Интересный эффект дало введение в геном растений гена человеческого интерферона JFN — одного из ключевых белков индукции иммунитета у млекопитающих. С помощью вируса мозаики цветной капусты геном интерферона был трансформирован в растения турнепса, табака, картофеля, что повысило устойчивость этих растений к вирусным

заболеваниям. Однако в настоящее время более перспективными считаются методы, основанные на использовании растительных генов, обуславливающих высокую устойчивость трансформации растений и низкую устойчивость к фитопатогенам.

5.2.7 Устойчивость растений к гербицидам

В настоящее время в сельском хозяйстве широко используют гербициды — химические соединения, применяемые для уничтожения сорной растительности. Гербициды широкого спектра действия могут не только уничтожать сорняки, но и угнетать рост культурных растений. В связи с этим возникает необходимость в создании растений, устойчивых к этим веществам. Существует два подхода к решению этой проблемы: прямая селекция устойчивых к гербицидам мутантных форм растений, или мутантных клеточных штаммов (клеточная селекция), и генно-инженерный метод, который состоит во введении в растения генов гербицид-резистентности растительного или бактериального происхождения.

Изучение механизмов устойчивости служит основой для создания трансгенных растений. Оно включает четыре основных этапа: выявление мишеней действия гербицидов в клетке растений; отбор растений, устойчивых к данному гербициду в качестве источника генов резистентности; идентификация и клонирование этих генов; изучение их экспрессии для использования в трансгенных конструкциях.

Благодаря использованию методов генетической инженерии были созданы новые, устойчивые к различным гербицидам сельскохозяйственные культуры. В геном этих культур вводились мутантные гены, кодирующие синтез ферментов, на которые гербициды (атразин, бромоксилин, имидазол) не оказывают негативного действия. Например, растения лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) были трансформированы с помощью штамма A281/pCBE21. Эта бактерия содержит плазмиду со встроенным геном, кодирующим фермент, придающий устойчивость к гербициду биалофосу. Трансгенные растения содержали ген *bar* и были невосприимчивы к гербициду (А.М. Стефанович, Г.Н. Ралдугана, 1999). Однако в тканях таких растений наблюдается накопление гербицидов, и использовать эти растения можно только в технических целях. Вместе с тем было показано, что введение генов, кодирующих другие ферменты, позволяет проводить детоксикацию гербицидов, создавая, таким образом, растения, пригодные в пищу. Так, детоксикация действующего вещества гербицида 2,4-D осуществляется при переносе в растение гена монооксигеназы, глифосата — при введении гена фосфонатазы, бромоксилина — гена нитрилазы.

5.2.8 Устойчивость растений к насекомым

Создание трансгенных растений, устойчивых к насекомым, с помощью методов генной инженерии стало возможным после того, как было обнаружено, что бактерии *Bacillus thuringiensis* синтезируют специфический белок — про-

тотоксин, высокотоксичный для насекомых. Попадая в кишечник насекомого, этот белок расщепляется, образуя активную форму токсина. В результате насекомое погибает. Ген, ответственный за экспрессию протоксина, удалось обнаружить, выделить из генома *B. thuringiensis* и с помощью бинарного вектора ввести в геном растений табака. Аналогичным образом растения томата были трансформированы генами другого инсектицидного белка — эндотоксина. В итоге были получены первые трансгенные растения, которые не повреждали насекомых.

5.2.9 Устойчивость растений к абиотическим стрессам

Адаптация растений в природе к неблагоприятным условиям среды обеспечиваются тремя способами. Во-первых, с помощью физиологических механизмов, позволяющих растениям избежать неблагоприятных воздействий (например, период покоя). Во-вторых, адаптация осуществляется благодаря морфологическим приспособлениям: толстому слою кутикулы на листьях, уменьшению листовой поверхности, ее опушению, которые предотвращают излишнюю потерю влаги растениями. В-третьих, негативное влияние внешней среды может быть преодолено с помощью изменений метаболизма. Третий механизм адаптации наиболее доступен для генно-инженерных исследований. Например, известно, что при водном стрессе у высших растений основным защитным механизмом, связанным с изменением метаболизма, является накопление в клетках пролина, глицинбеатина других осмопротекторов.

Экспериментально было доказано, что стрессовый ответ у бактерий и высших растений выражается одинаково. И у растений, и бактерий начинается усиленный синтез молекул осмопротекторов. Механизм их действия состоит в установлении осмотического баланса между цитоплазмой и окружающей средой, а также стабилизации белковых молекул. В бактериях биосинтез пролина хорошо изучен. Известны гены, кодирующие ферменты этого процесса. Избирательная экспрессия генов осмопротекторов может привести к увеличению адаптационных качеств. Поэтому для создания устойчивых к стрессам растений были клонированы бактериальные гены, получены векторные конструкции на основе T_1 -плазмид и введены в растения. Полученные трансгены синтезировали и накапливали пролин в 4—6 раз интенсивнее, чем обычные растения. Побеги трансгенных растений могли укореняться и расти при концентрации соли в среде 20 г/л (350 мМ).

У растений адаптация к низким температурам связана с многими физиологическими изменениями. Накапливаются растворимые вещества, понижающие осмотический потенциал клеток, тем самым уменьшая вероятность образования крупных кристаллов льда. Также синтезируется большое количество белков с повышенным содержанием сульфгидрильных групп (-SH), которые обладают особо высокой способностью к гидратации, а гидратационная вода не замерзает. Повышение устойчивости растений к замерзанию с помощью методов генной инженерии началось с изменения генома не растений, а бактерий. Исследователи Колорадского университета (США) выяснили, что повреждению

растений при замерзании способствуют бактерии эпифитной (поверхностной) микрофлоры *Pseudomonas syringae* и *Erwinia herbicola*, белки которых служат центрами кристаллизации. Если обезвредить бактерии стрептомицином, то растения не замерзают при температуре - 8 °С. Но стрептомицин дорог и вреден, поэтому выгоднее было изменить генетику данного штамма бактерий, вырезав из генома определенный ген. Растения, инфицированные мутантным штаммом *P. syringae* росли при отрицательной температуре. Результаты показали, что бактерии мутантного штамма более живучи и способны вытеснить природный штамм, который, попадая в верхние слои атмосферы, способствует кристаллизации атмосферной влаги. Таким образом, уничтожение природного штамма могло бы привести к экологической катастрофе.

Работы, связанные с генной инженерией и возможности манипулирования генами растений в настоящее время важны и интересны для проведения фундаментальных исследований. Эти наблюдения позволяют изучать основы молекулярной и клеточной биологии растительной клетки, глубинные механизмы процессов, происходящих в ней. При этом важно задуматься о своевременности применения результатов генно-инженерных исследований и об их прикладном назначении.

5.3 Использование генетической инженерии в животноводстве

Применение методов генетической инженерии в животноводстве открывает перспективу изменения ряда свойств организма: повышение продуктивности, резистентности к заболеваниям, увеличение скорости роста, улучшение качества продукции и др. Животных, несущих в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, принято называть *трансгенными*, а ген, интегрированный в геном реципиента, — *трансгеном*. Продукт этого гена (белок) является трансгенным. Благодаря переносу генов у трансгенных животных возникают новые качества, а дальнейшая селекция позволяет закрепить их в потомстве и создавать трансгенные линии.

Получение трансгенных животных предусматривает ряд этапов: приготовление раствора ДНК для микроинъекции; извлечение эмбрионов из донорных организмов; микроинъекция ДНК и пересадка инъецированных эмбрионов в яйцеводы или после культивирования в матку синхронизированных реципиентов. У родившихся потомков исследуют экспрессию трансгена на уровне транскрипции и трансляции. Трансгенное потомство получают путем использования традиционных методов разведения животных. Следует отметить, что от приготовления инъекционного раствора ДНК (его чистоты, концентрации) во многом зависит эффективность получения трансгенных животных. Обычно гены транспортируют на ранних стадиях развития животного (в большинстве случаев на стадии зиготы и двухклеточных эмбрионов). Для трансформации генов в геном животного используют несколько методов:

- 1) микроинъекцию ДНК в пронуклеус зигот или в каждый бластомер у двухклеточного эмбриона;
- 2) введение ДНК с помощью ретровирусных векторов;

3) получение трансгенных химер из генетически трансформированных клеток и эмбрионов.

В настоящее время наиболее распространенный метод — микроинъекция ДНК (метод аналогичен микроинъекции ДНК у растений). Ее осуществляют специальной пипеткой (внутренний диаметр ее около 1 мкм), а количество инъецированного раствора ДНК составляет 1 — 2 мкл. После инъекции ДНК эмбрионы культивируют до момента пересадки реципиентам. Микроинъекция эмбрионов сельскохозяйственных животных значительно сложнее, чем микроинъекция эмбрионов мышей и кроликов.

После небольшого культивирования *in vitro* проинъецированные эмбрионы переносят в яйцеводы (хирургическим путем) реципиентов. Каждому реципиенту мыши, кролика и свиньи обычно пересаживают 20—30 инъецированных зигот, причем у свиней все эмбрионы трансплантируют в один яйцевод; у мышей и кроликов — отдельно по яйцеводам, а у овец, коз и крупного рогатого скота — по 2 — 4 эмбриона каждому реципиенту. Используя методы блот-анализа, дот-блот-анализа и ПЦР, получают доказательства интеграции и экспрессии ДНК трансгенных животных. Для этого используют ядродержащие клетки тканей или внутренних жидкостей реципиента, из которых выделяют ДНК.

При исследовании у трансгенных животных выделяют РНК из тех тканей, в которых предполагается наиболее высокий уровень экспрессии. Качественный и количественный анализы экзогенных белков позволяют судить об уровне трансляции инъецированного генного материала.

Генетический анализ родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства показал, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях, в трансгенных линиях могут появляться мозаики.

Мозаика - животные, происходящие из одной зиготы, но имеющие разные генотипы.

Помимо клеточных линий, содержащих трансген, они имеют еще и нетрансгенные клеточные линии. Подсчитано, что около 30 % первичных трансгенных животных, полученных методом микроинъекции ДНК, — мозаики. Это затрудняет создание чистых трансгенных линий животных и объясняет, что трансген не передается потомству с ожидаемой по законам Менделя частотой 50 %. Часть мозаики вообще не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

Одна из важнейших задач сельскохозяйственной биотехнологии — выведение трансгенных животных с улучшенной продуктивностью и более высоким качеством продукции, резистентностью к болезням, а также создание так называемых *животных-биореакторов* — продуцентов ценных биологически активных веществ.

Особый интерес представляют гены, кодирующие белки каскада гормона роста: непосредственно гормон роста (ГР), рилизинг-фактор гормона роста (РФ) и инсулинподобный фактор ГР (ИФГР).

В конце 70-х годов XX в. на основе технологии рекомбинантной ДНК удалось получить гормон роста микробного происхождения. Было показано, то

ГР оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию и рост животного, как и гипофизарный ГР. Гормон роста, полученный с помощью методов генетической инженерии, при крупномасштабном применении вызывал увеличение удоев на 23 — 31 % при дозе 13 мг в день. Разработаны формы препарата пролонгированного действия, позволяющие использовать его один раз в две недели и даже в месяц. При ежедневной инъекции ГР молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец удалось увеличить суточные привесы на 20 — 30 % при значительном сокращении расхода кормов на единицу прироста. У молодняка свиней с ускорением роста увеличивалось содержание белка и уменьшалось содержание жира в тканях, что повышало качество мясопродуктов.

Первые трансгенные мыши с геном ГР были получены в 1982 г. У них отмечалось повышение скорости роста и увеличение конечной живой массы. Однако у трансгенных свиней с геном ГР (1989) увеличение роста не наблюдалось.

По данным Л. К. Эрнста (1996), у трансгенных свиней с геном рилизинг-фактора гормона роста (РФ ГР) живая масса была на 15,7 % выше, чем у контрольных животных. У потомства трансгенных свиней, получавших модифицированный кормовой рацион с повышенным содержанием белка (18 % сырого протеина) и с дополнительным количеством лизина, отмечались более высокие среднесуточные привесы (на 16,5 %).

У трансгенных овец с генами ГР и РФ ГР, даже при повышенном уровне ГР, скорость роста не увеличивалась. У трансгенных свиней вместе с повышением содержания белка наблюдалось и двукратное уменьшение толщины шпика (7 — 8 мм у трансгенных против 18 — 20 мм у контрольных животных); аналогичные показатели отмечены у трансгенных овец (25 — 30 % жира у контрольных животных против 5 — 7% у трансгенных овец).

Проводятся исследования о возможности уменьшения лактозы в молоке путем создания животных, у которых присутствует специфический для молочной железы промотор, соединенный с геном фермента β -галактозидазы, катализирующей распад лактозы. Молоко таких животных, не содержащее лактозы можно использовать для приготовления детского питания или употреблять людям с β -галактозидазной недостаточностью. Ведутся работы по получению генных конструкций, вырабатывающих антитела, предотвращающие маститы, и внесение их в геном трансгенных животных.

Еще одна важная задача генной инженерии в животноводстве — выведение трансгенных животных, *устойчивых к заболеваниям*.

Потери в животноводстве, вызванные различными болезнями, достаточно значительны, поэтому все более важное значение приобретает селекция животных по резистентности к болезням, вызываемых микроорганизмами, вирусами, паразитами и токсинами. Пока результаты селекции на устойчивость животных к различным заболеваниям невелики, но обнадеживают.

Например, созданы популяции крупного рогатого скота с примесью крови зебу, устойчивые к некоторым кровепаразитарным заболеваниям. Установлено, что защитные механизмы инфекционных заболеваний обусловлены либо препятствием вторжению возбудителя, либо изменением рецепторов. Вторже-

нию возбудителей, равно как и их размножению, препятствуют в основном иммунная система организма и экспрессия генов главного комплекса гистосовместимости. Одним из примеров гена резистентности у мышей служит ген Mx. Этот ген, обнаруженный и в модифицированной форме у всех видов млекопитающих, вырабатывает у Mx⁺-мышей иммунитет к вирусу гриппа А. Ген Mx⁺ был выделен, клонирован и использован для получения трансгенных свиней, экспрессирующих ген Mx на уровне РНК. Однако данные о трансляции Mx-протеина, обуславливающего устойчивость трансгенных свиней к вирусу гриппа А, пока не получены. Ведутся исследования в целях получения трансгенных животных, резистентных к маститу за счет повышения содержания белка лактоферина в тканях молочной железы. На культуре клеток из почек трансгенных кроликов было показано, что клеточные линии, содержащие трансгенную антисмысловую РНК, имели резистентность против аденовируса H5 (Ad₅) более высокую на 90 — 98% в сравнении с контрольными линиями клеток. Л.К. Эрнст продемонстрировал также устойчивость трансгенных животных с геном антисмысловой РНК к лейкозу крупного рогатого скота, к заражению вирусом лейкоза.

Показана возможность конструирования системы внутриклеточной иммунизации против инфекционных вирусов с участием мутационных форм эндогенных вирусных белков, защищающих от соответствующих вирусов. Так, получены трансгенные куры, устойчивые к лейкозу, у которых в клетках присутствовал белок вирусной оболочки.

Одна из важнейших задач стратегии использования трансгенных животных в медицине — получение *биологически активных соединений* за счет включения в клетки организма генов, вызывающих у них синтез новых белков.

Трансгенные животные как продуценты ценных биологически активных белков и гормонов имеют ряд преимуществ перед микроорганизмами и клеточными системами. При этом важно, что новые белки, получаемые в линиях клеток трансгенных животных, могут быть модифицированы, их активность сравнима с активностью протеинов. Для молочного производства представляет большой интерес получение целенаправленной трансгенной экспрессии в эпителиальные клетки молочной железы с целью выхода белков с молоком. Один из основных этапов получения трансгенных животных, продуцирующих гетерогенный белок с молоком, — идентификация промотора, направляющего экспрессию структурных генов в секреторный эпителий молочной железы.

В настоящее время выделены гены и промоторы α S1-казеина, β -казеина, α -лактоальбумина, β -лактоглобулина и сывороточного кислого протеина (WAP). Молочная железа — великолепный продуцент чужеродных белков, которые можно получать из молока и использовать в фармацевтической промышленности. Из молока трансгенных животных извлекают несколько рекомбинантных белков: человеческий белок С, антигемофильный фактор IX, α -1-антитрипсин, тканевой плазменный активатор, лактоферин, сывороточный альбумин, интерлейкин-2, урокиназу и химозин. В большинстве проектов, за исключением α -1-антитрипсина и химозина, эти исследования пока на стадии

разработки и ведутся в основном на трансгенных мышах, поэтому оценивать их с точки зрения коммерческого интереса рано.

Изложенные факты можно проиллюстрировать следующими примерами. В США осуществлен метод микроинъекции ДНК, отвечающий за экспрессию β -лактоглобулина, который способен продуцироваться только в молочных железах животных. В Эдинбурге в 1992 г. были выведены трансгенные овцы с геном α -1-антитрипсина человека и β -глобулиновым промотором. Содержание этого белка у разных трансгенных овец составляло от 1 до 35 г/л, что соответствует половине всех белков в молоке. При таком уровне продукции белка может быть получено около 10 кг трансгенного белка от одного животного в год, что достаточно для 50 пациентов при лечении эмфиземы легких. Обычно выход рекомбинантных белков в системах с использованием культуры клеток составляет около 200 мг/л, а у трансгенных животных он может повышаться до 1 л. Следует заметить, что создание клеточных культур и их выращивание в промышленных реакторах, а также выведение трансгенных животных и их обслуживание — дорогие и сложные процедуры. Однако трансгенные животные легко размножаются, содержание их сравнительно дешево, что делает этих животных хорошими продуцентами разнообразных белков с низкой стоимостью. В России группой ученых под руководством Л. К. Эрнста получены трансгенные овцы с геном химозина, в 1 л молока которых содержится 200—300 мг химозина — основного компонента для производства сыра. Стоимость его будет в несколько раз ниже продукта, получаемого традиционным способом из сычуга молочных телят и ягнят. Учеными приведены данные, свидетельствующие о высокой эффективности производства сыра с использованием химозина молока трансгенных овец. Так, из 3 л молока трансгеной овцы можно получить достаточное количество химозина, производства 1 т сыра из коровьего молока.

5.3.1 Основные методы контроля генетически-модифицированной продукции

В настоящее время более 50 млн га (территория 2-х Великобританий) занято трансгенными растениями. 60% площадей их посевов занимают в США и Канаде. Трансгенные культуры также выращивают в Аргентине, Португалии, Индии, Китае. Более 80% всех площадей занимает трансгенная соя. В настоящее время в странах Северной Америки и Европы разрешены к применению более 20 сортов трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, таких важных сельскохозяйственных культур, как кукуруза, хлопок, рис, соя, пшеница, картофель, томаты, лен. Проходят полевые испытания трансгенные сорта клубники, сахарной свеклы и некоторых цветочных культур. Всего в мире трансгенными сортами и гибридами, устойчивыми к гербицидам, засеяно около 34 млн. гектаров, или 80% от всех посевов трансгенных сортов. Среди них наиболее распространены устойчивость свойства гербицидам, что позволяет сокращать применение средств химической защиты растений в сельском хозяйстве. При создании кукурузы с устойчивостью к кукурузному мотыльку в сорта кукурузы ввели ген из *Bacillus thuringiensis* ответственный за биосинтез инсекти-

цидного белка – прототоксина (в кишечнике насекомого он превращается в токсин и насекомое гибнет). Созданы сорта картофеля устойчивый к колорадскому жуку (например, в центре «Биоинженерия» академик Скрыбин Константин Георгиевич создал сорт Невский), для других насекомых эти сорта вреда не причиняют. Трансгенная кукуруза практически не поражается грибковыми заболеваниями, так как не происходит накопление микотоксинов. Зерновые и зерно-бобовые устойчивы к фузариозу, ржавчине. Для защиты от патогенов в генотип встраивают гены, отвечающие за синтез хитиназы и глюконазы, которые обладают высоким антибактериальным эффектом. Созданы также микробиологические препараты по борьбе с колорадским жуком, а также фузариозами и другими болезнями растений.

В России трансгенные растения выращивать запрещено, но ввозить и перерабатывать можно. При содержании в продукте более 5% трансгенного сырья информацию об этом необходимо вынести на этикетку для потребителя. В Европе этот процент составляет 0,9%. В Америке работа с трансгенными растениями идет более 30 лет, и продукты полученные из трансгенного сырья вывели из под усиленного контроля. По мнению американских ученых трансгенные растения ничем не отличаются от обычных растений при их применении.

Важным этапом оценки биобезопасности генно-инженерно-модифицированных организмов и полученных из них пищевых и других продуктов является санитарно-гигиеническая экспертиза, которую проводит Институт питания Российской академии медицинских наук (РАМН). В институте проверяют:

- 1) химический состав исходных и трансгенных растений;
- 2) не ухудшилась ли биологическая ценность и усвояемость приготовленных из ГМО продуктов;
- 3) не могут ли ГМО и полученные из них продукты вызывать аллергию или влиять на иммунную систему человека;
- 4) не окажутся ли они токсичными, канцерогенными или мутагенными;
- 5) не влияют ли они на репродуктивные функции животных и человека.

Испытание генетически измененных растений на биобезопасность проводят также специалисты в Институте фитопатологии и Институте биологической защиты растений РАСХН, Центре биоинженерии РАН. Они изучают участки ДНК, встроенные в геном растений, проверяют, не сможет ли введенный ген переноситься в другие организмы и будет ли передаваться потомкам растений; изучают, не влияет ли новый ген на поражаемость растений болезнями и повреждаемость вредителями; не влияют ли трансгенные растения на почвенную микрофлору и другие составляющие биоценоза.

Обязательной и крайне важной является также медикобиологическая оценка пищевой продукции, полученной из ГМО. Разработаны методические указания «Медико-биологическая оценка пищевой продукции из генетически модифицированных источников». Они введены в действие Минздравом РФ 1 июня 2000 г. Методическими указаниями установлены порядок гигиенической экспертизы и государственной регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников. Утверждены методики медико-

гигиенической, медико-биологической оценки и клинических испытаний новых видов пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников. Методические указания являются официальным изданием и их выполнение должно строго контролироваться Минздравом РФ, а также соответствующими юридическими и правовыми органами РФ.

Контрольные вопросы:

1. В чем отличия генной инженерии от геномной инженерии?
2. На чем основывается генная инженерия?
3. Принципы и задачи инженерной энзимологии.
4. Где в сельском хозяйстве применяются генно-инженерные методы?
5. Что такое «векторы», принципы их применения?
6. Преимущества и недостатки векторов на основе Ti- плазмид.
7. Принципы применения векторов на основе ДНК- содержащих вирусов растений.
8. Охарактеризуйте методы прямого переноса генов в растения.
9. Этапы получения трансгенных растений.
10. Какими способами повышают при помощи генной инженерии физиологические свойства растений и их устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды.
11. Этапы получения трансгенных животных.
12. Методы трансформации генов в геном животного.
13. Принципы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных с помощью генной инженерии.
14. Принципы выведения трансгенных животных устойчивых к заболеваниям.
15. Основные методы контроля, за применением генетически-модифицированного сельскохозяйственного сырья при производстве пищевой продукции.

Тест для самоконтроля освоения курса дисциплины

1. Назовите синоним слова ферменты:
 - 1) энзимы;
 - 2) витамины;
 - 3) гормоны.
2. Сколько существует основных классов ферментов:
 - 1) три;
 - 2) пять;
 - 3) шесть.
3. Что не является классом ферментов:
 - 1) оксидоредуктазы;
 - 2) лигазы;
 - 3) фосфатазы.
4. Ферменты – биологически активные вещества являются биологическими:
 - 1) катализаторами;
 - 2) анализаторами;
 - 3) ингибиторами.
5. Фермент, катализирующий расщепление лактозы называется:
 - 1) α - галактозидаза;
 - 2) β - галактозидаза;
 - 3) γ - галактозидаза.
6. Как называется молочный сахар:
 - 1) фруктоза;
 - 2) глюкоза;
 - 3) лактоза.
7. Какой цифрой фермента обозначен подкласс, к которому он относится:
 - 1) первой;
 - 2) второй;
 - 3) третьей.
8. При какой температуре в молоке инактивируется фермент пероксидаза:
 - 1) 40 °С;
 - 2) 60 °С;
 - 3) 80 °С.
9. По активности фермента каталазы в молоке определяют:
 - 1) эффективность пастеризации;
 - 2) эффективность гомогенизации;
 - 3) аномальность молока, соматические клетки.
10. Значение определения активности редуктазы в молочной промышленности:
 - 1) бактериальную обсемененность;
 - 2) эффективность гомогенизации;
 - 3) эффективность сепарирования.

11. Пероксидаза – фермент катализирующий окислительно-восстановительные реакции в присутствии:
- 1) кислорода O_2 ;
 - 2) перекиси водорода H_2O_2 ;
 - 3) водорода H_2 .
12. Фосфатаза теряет свою активность при:
- 1) $60^\circ C$;
 - 2) $40^\circ C$;
 - 3) $80^\circ C$.
13. Термолабильность фермента – это:
- 1) неустойчивость к высокой температуре;
 - 2) устойчивость к высокой температуре;
 - 3) независимость активности от температуры.
14. Назовите методы культивирования микроорганизмов:
- 1) баночный;
 - 2) поверхностный;
 - 3) водопроводный.
15. Для культивирования микроорганизмов глубинным методом используют:
- 1) бидоны;
 - 2) поддоны;
 - 3) ферментеры.
16. В основном ферменты двухкомпоненты – небелковый компонент называется:
- 1) кофермент;
 - 2) апофермент;
 - 3) эндофермент.
17. К какому классу ферментов относится амилаза:
- 1) оксидоредуктазы;
 - 2) трансферазы;
 - 3) изомераз.
18. Кислотность молока и молочных продуктов измеряют:
- 1) в градусах Цельсия;
 - 2) в градусах Тернера;
 - 3) в градусах Кельвина.
19. В молочной промышленности для определения эффективности пастеризации используют пробу на:
- 1) каталазу;
 - 2) фосфатазу;
 - 3) редуктазу.
20. Крепость раствора сычужного фермента измеряют:
- 1) в градусах;
 - 2) в секундах;
 - 3) в граммах.
21. Оптимальная температура, при которой «работает» сычужный фермент:

- 1) 35 °С;
- 2) 50 °С;
- 3) 60 °С.

22. Сычужный фермент в молочной промышленности используют при производстве:

- 1) сыра, творога;
- 2) кисломолочных напитков, сметаны;
- 3) сгущенного молока.

23. К первичным метаболитам микробного синтеза относят:

- 1) антибиотики;
- 2) токсины;
- 3) коферменты.

24. Перевариваемость пищевых продуктов входит в понятие:

- 1) пищевая ценность;
- 2) биологическая ценность;
- 3) энергетическая ценность.

25. Отношение количества незаменимой аминокислоты в продуктах к количеству в идеальном белке характеризуется понятием:

- 1) аминокислотный скор;
- 2) качественный белковый показатель;
- 3) индекс Озера.

26. Способность белка распадаться под действием протолитических ферментов пищеварительного тракта характеризует:

- 1) биологическую ценность;
- 2) истинную переваримость;
- 3) коэффициент использования белка.

27. Аминокислота с наименьшим аминокислотным скором называется:

- 1) лимитирующий;
- 2) минимальной;
- 3) незаменимой.

28. Единицы измерения энергетической ценности:

- 1) килокалории;
- 2) килограммы;
- 3) проценты.

29. Какое происхождение имеет солод в качестве источника ферментов:

- 1) животное;
- 2) растительное;
- 3) микробное.

30. Единицы измерения активности ферментных препаратов:

- 1) микромоль;
- 2) микрометр;
- 3) микрограмм.

31. Имобилизованный фермент – это:

- 1) растворимый фермент;
- 2) закрепленный на нерастворимом носителе;

- 3) неактивный фермент.
32. Не является способом иммобилизации:
- 1) инкапсулирование;
 - 2) адсорбция;
 - 3) инъекция.
33. При производстве ферментного препарата в нем контролируют:
- 1) температуру;
 - 2) активность фермента;
 - 3) влажность.
34. Способ выделения ферментов из раствора:
- 1) высаливание;
 - 2) выветривание;
 - 3) вытряхивание.
35. Аббревиатура ДНК расшифровывается:
- 1) рибонуклеиновая кислота;
 - 2) диоксиподобное соединение;
 - 3) дезоксирибонуклеиновая кислота.
36. Рекомбинантная ДНК:
- 1) разделенная ДНК на несколько;
 - 2) разрушенная ДНК;
 - 3) соединенная ДНК из нескольких источников.
37. Плазмида – это:
- 1) внеядерная молекула ДНК;
 - 2) ядерная молекула ДНК;
 - 3) разрушенная молекула ДНК.
38. Векторы в генной инженерии это:
- 1) движущиеся ДНК;
 - 2) кольцевые ДНК;
 - 3) направленные ДНК.
39. Назовите метод прямого переноса генов в растение:
- 1) макроинъекции;
 - 2) электропорация;
 - 3) упаковка в пакеты.
40. Особенность ферментов:
- 1) групповая специфичность;
 - 2) классовая специфичность;
 - 3) отрядная специфичность.
41. Энергия, необходимая для запуска химической реакции:
- 1) энергия адаптации;
 - 2) энергия мотивации;
 - 3) энергия активации.
42. Изоэлектрическая точка для фермента это:
- 1) оптимальная рН;
 - 2) рН начала коагуляции;
 - 3) температурный минимум фермента.

43. Сколько цифр в шифре фермента:
- 1) две;
 - 2) три;
 - 3) четыре.
44. Какая цифра в шифре фермента указывает класс, к которому он принадлежит:
- 1) первая;
 - 2) вторая;
 - 3) третья.
45. Какая цифра в шифре указывает порядковый номер фермента:
- 1) третья;
 - 2) четвертая;
 - 3) вторая.
46. Название какого класса ферментов в современной номенклатуре заканчивается на – аза:
- 1) трансферазы;
 - 2) лигазы;
 - 3) оксиредуктазы.
47. Какой особенностью обладают биологические катализаторы ферменты :
- 1) специфичностью;
 - 2) универсальностью;
 - 3) лояльностью.
48. Температурный оптимум работы большинства предметов приходится на какую температуру:
- 1) 30⁰С;
 - 2) 40⁰С;
 - 3) 50⁰С.
49. Единицы измерения молекулярной массы белков:
- 1) килограмм;
 - 2) дальтон;
 - 3) миллиграмм.
50. Что такое денатурация:
- 1) разрушение белковой молекулы;
 - 2) восстановление белков молекулы;
 - 3) объединение белковой молекулы.
51. В каких отраслях народного хозяйства используется биотехнология:
- 1) машиностроение;
 - 2) градостроение;
 - 3) сельское хозяйство.
52. При производстве каких продуктов используются биотехнологические процессы:
- 1) сыра;
 - 2) кондитерских изделий;
 - 3) молочных консервов.
53. Исходная среда в процессе ферментации называется:

- 1) субстрат;
 - 2) инокулят;
 - 3) концентрат.
54. К какому классу относится фермент папаин:
- 1) оксиредуктаз;
 - 2) изомераз;
 - 3) гидролаз.
55. Фермент липаза катализирует расщепление:
- 1) белков;
 - 2) жиров;
 - 3) углеводов.
56. Какую структуру имеют ферменты, являясь белками:
- 1) первичную;
 - 2) вторичную;
 - 3) четвертичную.
57. В названии ферментного препарата цифрами обозначают:
- 1) срок годности;
 - 2) степень чистоты;
 - 3) способ культивирования.
58. Назовите фермент β -фруктофуранозидаза согласно тривиальной номенклатуре:
- 1) сахараза;
 - 2) каталаза;
 - 3) лактаза.
59. Ферменты протеазы катализируют расщепление:
- 1) жиров;
 - 2) белков;
 - 3) углеводов.
60. В производстве какого продукта используют фермент ливертаза:
- 1) сыр;
 - 2) фруктовых начинок;
 - 3) сыровяленная колбаса.

Список использованной и рекомендуемой литературы

1. Аникина, Е.Н. Ферментация молочно-растительной основы биопродукта./ Е.Н. Аникина, О.В. Пасько// Молочная промышленность.- 2013. - №9. – С.78.
2. Биотехнология: учебник / под ред. Е.С. Воронина. – СПб.: ГИОРД.- 2008. – 704 с.
3. Биотехнология : учебное пособие / под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. – М.: Высш. Школа.- 1987. – 143 с.
4. Биотехнология клеток животных : В.2 т. / под ред. Р.Е. Спiera : пер. с англ. – М.: Агропромиздат.- 1989. – 721с.
5. Биотехнология размножения животных : метод. указания / Нижегородская ГСХА. – Нижний Новгород. - 2001. – 81 с.
6. Биотехнология растений : культура клеток : пер. с англ. – М.: Агропромиздат. - 1989. – 280 с.
7. Биотехнология сельскохозяйственных растений / пер. с англ. В.И. Негрука. – М.: Агропромиздат. - 1987. – 301 с.
8. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии : учебное пособие – М.: КолосС. - 2004. – 296 с.
9. Варфоломеев, С.Д. Биотехнология : кинетические основы микробиологических процессов : учебное пособие – М.: Высш. Школа. - 1990. – 296 с.
10. Виноградская, С.Е. Биотехнологические особенности домашнего айранаб создание промышленной технологии./ Молочная промышленность.- 2013. - №10. – С.52.
11. Головин, М.А. Холестерин редуцирующие пробиотические бактерии в молочной промышленности./ М.А. Головин, В.И. Ганина, Н.Г. Машенцев.// Молочная промышленность.- 2014. - №5. – С.46.
12. Голубев, В.Н. Пищевые и биологически активные добавки./ В.Н. Голубев, Л.В. Чичева-Филатова, Т.В. Шденская.//.- М.: И.ц. «Академия».- 2003.- 208с.
13. Грачева, И.П. Технология ферментных препаратов./ И.М. Грачева, А.Ю. Кривова.- 3е изд. перераб. и доп.//.- М.: Эльвар.-2000.-512 с.
14. Давыдова, Р. Некоторые аспекты производства биопродуктов из мяса/ Мясные технологии.- 2013. - №3. – С.38.
15. Давыдова, Р. Стартовые и защитные культуры – естественная микрофлора пищевых продуктов./ Мясные технологии.- 2014. - №11. – С.41.
16. Даничук, Т.Н. Низколактозные молочные продукты. Пути получения./ Т.Н. Даничук, В.И. Ганина, М.А. Головин // Молочная промышленность.- 2013. - №11. – С.41.
17. Димова, О.В. Обогащение кисломолочных продуктов микрокапсулированным β - каротином/ О.В. Димова и др.// Молочная промышленность.- 2013. - №9. – С.42.
18. Дымар, О.В. Технологические аспекты использования микропарткуллятов сывороточных белков при производстве молочных продуктов./ Молочная промышленность.- 2014. - №6. – С.18.

19. Егорова, Е.М. Эффективность биологически активных веществ при выращивании огурцов./ Аграрная наука.- 2013. - №11. – С.20.
20. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших учебных заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия». - 2006. – 208 с.
21. Ибрагимов, Э.Р. Выявление устойчивых генов желтой ржавчины и применение их в селекции./ Аграрная наука.- 2013. - №9. – С.17.
22. Иванова, Л.А. Пищевая биотехнология. Кн. 2 Переработка растительного сырья : учебное пособие – М.: КолосС. - 2008. – 472 с.
23. Исаева, А.В. Органические отходы мясокомбинатов как перспективный источник энергии./ А.В. Исаева, Д.А. Молоканов // Мясные технологии.- 2013. - №11. – с42.
24. Использование эссенциальных фосфолипидов для улучшения качества спермы хряков-производителей./ А.Г. Нарижный и др.// Зоотехния.- 2014. - №5. – С.28.
25. Касынкина, О.М. Биотехнология : метод .пособие. – Пенза, 2002. – 58 с. Косой, В.Д. Инженерная реология биотехнологических сред : учебное пособие – СПб.: ГИОРД - 2005. – 648 с.
26. Квесидадзе, Г.И. Введение в биотехнологию./ Г.И. Квесидадзе, А.М. Безбородов// - М.: Наука – 2002.- 284с.
27. Келети, Т. Основы ферментной кинетики.- М.: Мир, 1990- 348с.
28. Кислухина, О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов.-М.: Де-Ли принт.- 2002- 336с.
29. Колеснов, А.Ю. Биохимические системы в оценке качества продуктов питания.- М.: Пищевая промышленность. - 2000.-414с.
30. Коррекция микробиоценоза кишечника поросят в ранний постнатальный период как биотехнологический пример профилактики желудочно-кишечных заболеваний/ В.П. Ибрагимов и др.// Ветеринария сельскохозяйственных животных.- 2013.-№5 - С. 35.
31. Крусь, Г.Н. Методы исследования молока и молочных продуктов: учебник/ Г.Н. Крусь, А.М. Шалыгина, З.В. Волокитина под общей редакцией А.М. Шалыгиной. – М.: КолосС. - 2002. – 368 с.
32. Кязимов, Н.Н. Использование гексаплоидных гибридов в селекции хлопчатника./ Аграрная наука.- 2013. - №6. – С.17.
33. Лавренов, С. Что лучше: глюконо-дельта-лактин или стартовые культуры?/ С. Лавренов, Chr. Hansen.// Мясные технологии. - 2013. - №9. – С.34.
34. Лифанова, С.П. Влияние использования в рационах коров препарата с высокой биодоступностью бетакаротина на продуктивность и технологические свойства молока./ С.П. Лифанова, В.Е. Улитко.// Зоотехния.- 2014. - №8. – С.24.
35. Маджитов, Д.Ф. Чего вы еще не знаете о транsgлютаминазе/ Мясные технологии.- 2013. - №12. – С.10.
36. Методы исследований в биотехнологии сельскохозяйственных животных : школа-практикум / под ред.Н.А. Зиновьевой. – М.: ВИЖ. - 2002. – 78 с.

37. Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК./ под. ред. В.А. Полякова.-М.: Пищепромиздат. -2004.- 320 с.
38. Микробные ферменты и биотехнология./ под. ред. В.М. Фогарти.- М.: Агропромиздат. - 1986. -318с.
39. Микропартикулированные сывороточные белки в технологии синбиотических продуктов./ А.Н. Пономорев и др.// Молочная промышленность.- 2013. - №7. – С.62.
40. Молекулярно-генетический подход к анализу микрофлоры силоса./ Л.А. Ильина и др.// Зоотехния.- 2013. - №10. – С.8.
41. Неверова, О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения : учебник – Новосибирск. - 2007. – 415 с.
42. Никульников, В.С. Биотехнология в животноводстве : учебное пособие – М.: КолосС.- 2007. – 544 с.
43. Охрименко, О.В. Лабораторный практикум по химии и физике молока / О.В. Охрименко, К.К. Горбатова, А.В. Охрименко. – СПб.: ГИОРД. - 2005. – 256 с.
44. Оценка биоцидности внутренней среды гидробионтов по активности катионных неферментных белков лизосом фагоцитов/ Г.В. Забелин и др.// Ветеринария сельскохозяйственных животных.- 2013.-№6 - С. 49.
45. Перфильева, А.И. Пестициды- ингибиторы митохондрий: механизм действия и опасность использования./ А.И. Перфильева, Е.В. Рымарева, Е.Г. Рихванов.// Аграрная наука.- 2013. - №11. – С.15.
46. Пирохунова, Ф.Н. действие микроэлементов и стимулятора диацетатмоноэтаноламина на рост хлопчатника./ Аграрная наука.- 2013. - №10. – С.18.
47. Пищевая химия / под ред. А.П. Нечаева.// – СПб.: ГИОРД. - 2001. – 562 с.
48. Помозов, В.А. производство кваса и безалкогольных напитков/ Учеб. пособие. - СПб.: ГИОРД. -2006.- 192 с.
49. Пробиотические продукты. Новые приемы повышения качества./ Н.Г. Лайко и др.// Молочная промышленность.- 2013. - №10. – С.57.
50. Разумовский, М.В. Роль эмульгаторов в стабилизации вкусоароматических свойств./ Мясные технологии.- 2014. - №3. – С.26.
51. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология : учебник Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии. – М.: КолосС. - 2004. – 440 с.
52. Рябцева, С.А. Дрожжи в молочной отрасли: классификация, свойства, применение./ С.А. Рябцева, С.Е. Виноградская, А.А. Панфилова.// Молочная промышленность.- 2013. - №4. – С.64.
53. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник /В.С. Шевелуха, Е.А. Калашников, Е.С. Воронин и др.; под ред. – М.: Высшая школа. - 2003. – 469 с.
54. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высш. Школа. - 2003. – 469 с.

55. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высш. Школа. - 1998. – 416 с.
56. Сидоров, В.А. Биотехнология растений : клеточная селекция – Киев: Наукова думка. - 1990. – 279 с.
57. Смирнов, Д.Ю. Мясная продуктивность свиней при использовании в рационах ферментных препаратов./ Д.Ю. Смирнов, А.Ю. Лаврентьев.// Зоотехния.- 2014. - №1. – С.16.
58. Сорокина, Н.П. Производство ферментированных молочных продуктов и сыров; состав и свойства заквасочной микрофлоры./ Н.П. Сорокина, И.В. Кучеренко.// Молочная промышленность.- 2013. - №6 – С.38.
59. Сорокина, Н.П. Производство ферментированных молочных продуктов и сыров; состав и свойства заквасочной микрофлоры./ Н.П. Сорокина, И.В. Кучеренко.// Молочная промышленность.- 2013. - №7 – С.54.
60. Харитонов, Е.М. Поиск генов широкой совместимости у образцов риса подвидов *indica* и *japonica*./Е.М. Харитонов, Ю.К. Гончарова.// Аграрная наука.- 2013. - №3. – С.15.
61. Худолей, В.В. Экологически опасные факторы./ В.В. Худолей, И.В. Мизгирев.// - СПб: Publishing House.- 1996.-521с.
62. Фараджева, Е.Д. Общая технология бродильных производств./ Е.Д. Фараджева, В.А. Федоров.// - М.:КолосС – 2007.- 896с.
63. Чемерилова, В.И. Основы генной инженерии.- Иркутск: Изд-во Иркутского университета, 1998.-140с.

Оглавление

Предисловие	1
1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ.....	8
1.1 Вводный инструктаж	8
1.2 Правила обращения с концентрированными веществами	9
1.3 Первая помощь при несчастных случаях	10
2. ЭНЗИМОЛОГИЯ	11
2.1 Место ферментативной биотехнологии в пищевой промышленности	13
1. Что такое каталаза?	24
2. Значение определения каталазы в молочной промышленности.	24
3. Сформулируйте сущность и методику определения активности каталазы в молоке. ...	24
4. Как рассчитывается активность каталазы?.....	24
5. Приготовление реактивов к анализу.	24
6. Охарактеризуйте фермент редуктаза.	24
7. Отличие проб на редуктазу с метиленовым голубым и резазурином.	24
8. Какое свойство редуктазы позволяет использовать ее в контроле бактериальной обсемененности молока?	24
2.2 Биотехнологические методы оценки качества молочных продуктов.....	24
3. МИКРОБНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ.....	37
3.1 Технология культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментов.....	42
3.2 Биотехнология производства метаболитов	47
4. ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ	54
4.1 Пищевая, биологическая и энергетическая ценности	54
5. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ.....	69
5.1 Инженерная энзимология, её задачи	72
5.2 Генная инженерия растений	72
5.2.1 Получение трансгенных растений.....	73
5.2.2 Методы прямого переноса генов в растения.....	77
5.2.3 Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава запасных белков растений	80
5.2.4 Повышение эффективности процесса фотосинтеза	81
5.2.5 Генно-инженерные подходы к решению проблемы усвоения азота	82
5.2.6 Устойчивость растений к фитопатогенам	84
5.2.7 Устойчивость растений к гербицидам	85
5.2.8 Устойчивость растений к насекомым	85
5.2.9 Устойчивость растений к абиотическим стрессам	86
5.3 Использование генетической инженерии в животноводстве	87

5.3.1 Основные методы контроля генетически-модифицированной продукции	91
Тест для самоконтроля освоения курса дисциплины	94
Список использованной и рекомендуемой литературы	100

Учебное издание

Елена Вячеславовна Иванова
Ольга Ивановна Солнцева

**Основы биотехнологии переработки
сельскохозяйственной продукции**

Учебное пособие

Печатается в авторской редакции

Физ. печ. листов 6,63

ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА.
214000, Смоленск, ул. Б. Советская, 10/2