

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБОУ ВО КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИНСТИТУТ «КАЗАНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ Н.Э. БАУМАНА»**

Кафедра биологии, генетики, общей и биологической химии

**Учебное пособие «Биохимия. Биоконверсия растительного сырья»
для студентов, обучающихся по направлению подготовки 35.03.07
Технология производства и переработки сельскохозяйственной
продукции**

Казань – 2025

УДК 557.15:633
ББК 28.072я73
ISSBN 978-5-6049724-5-8

Составители: кандидат с.-х. наук, доцент кафедры биологии, генетики, общей и биологической химии Касанова Н.Р., доктор с.-х. наук, профессор кафедры технологии производства и переработки сельхозпродукции Гайнуллина М.К., профессор кафедры химической кибернетики ФГБОУ ВО КНИТУ КХТИ Просвирников Д.Б.

Рецензенты:

Якимов О.А. – профессор, доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры технологии производства и переработки сельхозпродукции ФГБОУ ВО Казанского ГАУ. Сафина Н.Ю. – кандидат биологических наук, заведующий отделом физиологии, биохимии, генетики и питания животных ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН.

Учебное пособие «Биохимия. Биоконверсия растительного сырья» утверждено и рекомендовано к печати на заседании кафедры биологии, генетики, общей и биологической химии «15» сентября 2025 года (протокол № 3).

Учебное пособие «Биохимия. Биоконверсия растительного сырья» обсуждено, одобрено и рекомендовано к печати на заседании Методического совета ФГБОУ ВО Казанский ГАУ от «15» октября 2025 г (протокол № 1).

Биохимия. Биоконверсия растительного сырья: учебное пособие / Н.Р. Касанова, М.К. Гайнуллина, Д.Б. Просвирников, Е.Е. Головкова – Казань, Казанский ГАУ, 2025. – 114 с.

Учебное пособие «Биохимия. Биоконверсия растительного сырья» предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции.

© Касанова Н.Р., Гайнуллина М.К., Просвирников Д.Б., Головкова Е.Е.

© Казанский государственный аграрный университет, 2025 г.

Содержание

Введение	5
Список сокращений и условных обозначений	5
Техника безопасности при работе в химической лаборатории	8
1. Аминокислоты. Белки.....	14
1.1. Химическая природа аминокислот и белков	14
1.2. Физико-химические свойства белка	15
1.3. Классификация белков	19
1.4. Классификация и функции растительных белков	23
1.5. Цветные реакции на белки и аминокислоты.....	26
1.6. Методы осаждения и коагуляция белков.....	30
1.7. Методы количественного определения белков.....	34
1.8. Хроматографический анализ аминокислот.....	35
1.9. Определение общего азота по методу Кьельдаля	37
1.10. Определение белкового и небелкового азота по методу Кьельдаля	39
1.11. Определение белка по методу Лоури	40
1.12. Определение белка спектрофотометрическим методом (метод Варбурга и Кристиана)	40
2. Ферменты.....	41
2.1. Свойства ферментов.....	41
2.1.1. Изучение термолабильности ферментов.....	44
2.1.2. Влияние рН среды на активность ферментов.....	45
2.1.3. Определение активности ферментов	46
3. Углеводы.....	48
3.1. Качественные реакции на моносахариды	48
3.2. Олигосахариды и полисахариды	50
4. Биоконверсия растительного сырья.....	54
4.1. Общая характеристика и классификация растительного сырья ...	54
4.2. Состав растительных клеток	56
4.3. Ферментативная переработка растительного сырья	60
4.3.1. Гидролитические процессы.	60
4.3.2. Негидролитические реакции	79
4.3.3. Определение влажности зерна и продуктов его переработки	84

4.3.4. Метод выделения α- и β-амилаз и определение их активности	87
4.3.5. Технология производства крахмала в лабораторных условиях	91
4.3.6. Биоконверсия крахмала	94
4.3.7. Ферментативный гидролиз растительного сырья.....	97
Тестовые задания и контрольные вопросы.....	101
Список литературы	113

Введение

Биохимия – это наука, изучающая химический состав, структуру и свойства компонентов, обмен веществ и энергии в живом организме. В живом организме непрерывно происходит расход энергии, поглощаемой из внешней среды в виде химической энергии и преобразуемой клеткой в полезную энергию. Нормальное течение процессов жизнедеятельности организма требует сохранения относительного постоянства химического состава его клеток и тканей. Такое постоянство обеспечивается способностью живых клеток воссоздавать, ресинтезировать ранее разрушенные вещества. Основными субстратами для синтеза служат поступающие в организм из окружающей среды питательные вещества – белки, липиды, углеводы, витамины, кислород, соли и вода.

Биохимия развивается очень интенсивно и имеет не только познавательное, но и большое практическое значение для животноводства, растениеводства, генетики, ветеринарии и биотехнологии.

В данном учебном пособии рассматриваются закономерности состава и превращений химических соединений как в животной, так и в растительной клетке, исследует химический состав и процессы, протекающие при переработке и биотрансформации растительного сырья в полезные компоненты. Ферментативный гидролиз становится перспективным методом переработки побочных продуктов растительного происхождения в кормовые средства. Этот процесс улучшает усвояемость и функциональные свойства продуктов растительного происхождения, снижая при этом содержание антипитательных веществ.

Учебное пособие состоит из четырех основных разделов и направлено на формирование фундаментальных знаний по внедрению ресурсосберегающих технологий хранения и переработки продукции растениеводства. Предназначено для обучения студентов по направлению подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции.

Список сокращений и условных обозначений

АДФ – аденозиндифосфат

НАДФН(Н⁺) –

АлАТ – аланинаминотрансфераза

никотинамидадениндинуклеотидфос

АМК – аминокислота	фат восстановленный
АМФ – аденозинмонофосфат	ПВК – пировиноградная кислота
цАМФ – циклический АМФ	ПФ – пиридоксальфосфат
АПБ – ацилпереносящий белок	РНК – рибонуклеиновая кислота
АсАТ – аспартатаминотрансфераза	т-РНК – транспортная РНК
АТФ – аденозинтрифосфат	РНКаза - рибонуклеаза
АТФаза – аденозинтрифосфатаза	СДГ – сукцинатдегидрогеназа
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота	ТАГ – триацилглицеролы
ГАФ – глицеральдегид-3-фосфат	ТГФК – тетрагидрофолиевая кислота
ГДФ – гуанозиндифосфат	ТДФ – тимидиндифосфат
ГМГ-КоА – β-гидрокси-β-метилглутарил-КоА	ТМФ – тимидинмонофосфат
ГМФ – гуанозинмонофосфат	ТПФ – тиаминпирофосфат
цГМФ – циклический ГМФ	ТТФ – тимидинтрифосфат
ГТФ – гуанозинтрифосфат	ТХУ – трихлоруксусная кислота
ДАГ – диацилглицеролы	УДФ – уридиндифосфат
ДАФ – диоксиацетонфосфат	УМФ – уридинмонофосфат
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	УТФ – уридинтрифосфат
ДНКаза – дезоксирибонуклеаза	ФАД – флавинадениндинуклеотид окисленный
ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин	ФАДН ₂ – флавинадениндинуклеотид восстановленный
ДОФА – диоксифенилаланин	ФЕП – фосфоенолпируват
кат - катал	ФМН – флавинаденинмононуклеотид
ИМФ – инозинмонофосфат	Фн – неорганический фосфат
КоА – кофермент (коэнзим) А	ФФн – неорганический пирофосфат
КоQ – кофермент (коэнзим) Q	ФРПФ – 5-фосфорибозил-1-пирофосфат
КФ – классификация ферментов	ФФК – фосфофруктокиназа
КФК - креатинфосфокиназа	ФЭК – фотоэлектроколориметр
ЛДГ – лактатдегидрогеназа	ХЭ - холинэстераза
ЛП – липопroteины	ЦДФ – цитидиндифосфат
ЛПВП – липопroteины высокой плотности	ЦМФ – цитидинмонофосфат
ЛПНП – липопroteины низкой плотности	ЦТК – цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)
ЛПОНП – липопroteины очень низкой плотности	ЦТФ – цитидинтрифосфат
МАГ – моноацилглицеролы	ЩУК – щавелевоуксусная кислота
МАО - моноаминоксидаза	ЭПС – эндоплазматическая сеть

НАД ⁺ – никотинамидадениндинуклеотид окисленный	D – оптическая плотность
НАДН(H ⁺) – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный	D _{оп} – оптическая плотность опытного образца
НАДФ ⁺ – никотинамидадениндинуклеотидфос фат окисленный	D _{ст} – оптическая плотность стандартного образца
	D _к – оптическая плотность контрольного образца
	D _х – оптическая плотность исследуемого образца
	K _М – константа Михаэлиса
	V _{max} – максимальная скорость реакции

Техника безопасности при работе в химической лаборатории

Для обеспечения безопасности труда сотрудников и студентов в химической лаборатории следует руководствоваться международными стандартами лабораторной практики (GLP, Good Laboratory Practice), а также общегосударственными законами и ведомственными документами по технике безопасности при проведении работ в лаборатории.

Важное значение в обеспечении безопасности работ является правильная и рациональная организация труда сотрудников и студентов в химической лаборатории.

В химической лаборатории необходимо неукоснительно соблюдать правила техники безопасности и правила личной гигиены.

Каждого работника необходимо полностью информировать о требованиях по безопасности труда, принятых в лаборатории и о местах нахождения в рабочих помещениях средств противопожарной безопасности и аптечки первой помощи.

Для этого проводится инструктаж сотрудников и студентов по технике безопасности. Результаты инструктажа заносятся в специальный журнал.

Помещения лаборатории должны быть оборудованы специальными контейнерами для сбора мусора и производственных отходов. Утилизация отходов должна проводиться регулярно в соответствии со специальными требованиями по утилизации отходов.

В лаборатории работают в спецодежде. В качестве спецодежды в лаборатории используются лабораторные халаты и перчатки.

Халаты должны быть достаточно длинными и застегиваться полностью, при этом быть закрытыми спереди. Рукава должны плотно охватывать запястья. Перчатки должны быть удобными и достаточно длинными.

Защита глаз обеспечивается защитными очками с противоударными стеклами и защитными масками различной конструкции.

В случае необходимости для защиты органов дыхания используют респираторы различного типа (в зависимости от степени опасности).

Одноразовые средства защиты должны удаляться сразу после загрязнения.

Все помещения лаборатории должны быть оборудованы аптечками для оказания первой (неотложной) помощи, индивидуальными средствами защиты.

Все химические вещества (реактивы), используемые в химической лаборатории, подразделяются на 8 групп хранения в зависимости от степени их опасности (табл.1.).

Таблица 1– Классификация химических реактивов в биохимической лаборатории

Группа	Общие свойства	Перечень веществ	Условия хранения
I	Взрывчатые вещества	Нитроглицерин	В сейфе или в шкафу под замком
II	Вещества, выделяющие при взаимодействии с водой легковоспламеняющиеся газы	Литий, натрий, кальций металлические; кальция карбид	В сейфе или в шкафу под замком
III	Самовозгорающиеся вещества	Барий, карбид кальций, белый фосфор	В шкафу герметично без доступа O ₂
IV	Легковоспламеняющиеся жидкости (температура воспламенения ниже 61°C)	Диэтиловый эфир, ацетон, этанол	В металлическом ящике или в специальной заводской укладке
V	Легковоспламеняющиеся твердые вещества	Сера, фосфор красный	В сейфе или в шкафу под замком
VI	Окисляющие (воспламеняющие) реактивы	Калия перманганат, азотная кислота (конц.), нитраты щелочных металлов	В шкафу под замком, отдельно от реактивов IV и V групп
VII	Вещества повышенной физиологической активности (ядовитые)	Бром, аммиак, бария нитрат, свинца (II) оксид	В сейфе или в шкафу под замком
VIII	Малоопасные и	Натрия хлорид,	Нет особых

	безопасные вещества	сахароза, магния сульфат	условий хранения
--	---------------------	-----------------------------	---------------------

В лаборатории должна быть хорошая вентиляция, водопровод, проводка технического тока, канализация, установки для дистилляции воды.

Не допускается совместное хранение химических веществ (реактивов), способных к активному взаимодействию друг с другом.

Ядовитые и сильнодействующие вещества (включая лекарственные препараты списков А и Б) следует хранить в сейфе или специальном шкафу под замком и пломбой.

Вся посуда, содержащая реактивы и готовые реагенты, должна быть маркирована соответствующими этикетками.

Хранить химические вещества и готовые реагенты в таре без этикеток или с надписями, сделанными стеклографом на стекле, запрещается. Если этикетка утеряна, а идентифицировать содержимое не представляется возможным, содержимое подлежит уничтожению в соответствии с требованием правил утилизации химических веществ.

Емкости с химическими веществами, обладающими потенциально опасными свойствами, должны в обязательном порядке содержать маркировку в соответствии с требованиями ГОСТ: легковоспламеняющиеся вещества, взрывоопасные вещества материалы, едкие вещества, ядовитые вещества.

Требования безопасности перед началом работ

Не рекомендуется работать в лаборатории в одиночку, поскольку при несчастном случае некому будет оказать помощь пострадавшему и ликвидировать последствия возможной аварии.

Перед началом работ необходимо проверить исправность оборудования, вентиляции, водопровода, системы электропитания. В случае выявления неисправностей, создающих повышенную опасность, работа в лаборатории запрещается до их устранения.

Требования безопасности во время работы

Во время работы в лаборатории следует соблюдать порядок, чистоту и аккуратность, чтобы максимально избежать воздействия вредных и потенциально опасных факторов.

Работы в лаборатории должны проводиться в спецодежде, а при необходимости – с использованием соответствующих индивидуальных средств защиты.

Недопустимо превышение длительности рабочего дня над рекомендованными пределами, поскольку это приводит к ухудшению внимания сотрудников и существенно повышает риск производственных аварий.

Все работы можно проводить только в чистой посуде, не содержащей даже следовых количеств предыдущей анализируемой пробы или каких-либо реагентов. Использованная посуда должна сразу после проведения анализов мыться или складываться в специально отведенном месте для грязной посуды во избежание её повторного использования.

Во время нагревания жидких и твердых веществ в пробирках и колбах нельзя направлять их отверстия на себя или других людей. Нельзя заглядывать сверху в открыто нагреваемые сосуды во избежание возможных травм при выбросе горячей массы из сосуда.

При работе с приборами и аппаратами следует руководствоваться инструкциями и правилами, изложенными в их техническом паспорте и руководстве по эксплуатации.

В процессе эксплуатации аппаратуры должна быть исключена возможность её падения. Запрещается прикасаться к движущимся и вращающимся частям используемого оборудования.

Все электрические приборы должны быть заземлены, если отсутствие заземления не предусмотрено их конструкцией. По возможности следует избегать использования удлинителей.

Электроплитки, муфельные печи и иные электронагревательные приборы должны быть размещены на термоизолирующем материале.

Недопустимо оставлять во включенном состоянии без присмотра электронагревательные приборы, за исключением тех, что по своему назначению и конструкции предназначены для круглосуточной работы.

Брать в руки сосуды с любыми веществами и реагентами следует одной рукой за горлышко, а другой – аккуратно поддерживая сосуд снизу за дно.

Никакие вещества в лаборатории нельзя пробовать на вкус.

Нюхать вещества можно, лишь осторожно направляя на себя пары или газы легким движением руки, но ни в коем случае не наклоняясь к сосуду и не вдыхая пары (газы) полной грудью.

Пролитые жидкие вещества (реагенты), обладающие опасными свойствами, следует немедленно нейтрализовать, посуду тщательно обезвредить и очистить, запачканную одежду – обезвредить и передать в стирку.

Категорически запрещается затягивать реактивы в пипетки ртом!

Категорически запрещается уже отмеренные реактивы сливать (высыпать) обратно в сосуды, из которых их отмеряли!

Легковоспламеняющиеся вещества запрещается помещать в термостат!

При работе с едкими веществами необходимо пользоваться индивидуальными средствами защиты (перчатки, защитные очки).

Запрещается приливать воду к кислоте!

При работе с едкими и летучими веществами запрещается пользоваться контактными линзами.

Если пролилось едкое вещество, то следует немедленно засыпать его сухим песком, удалить его и тщательно промыть место разлива водой.

Запрещается выливать ртуть в канализацию, для сбора ртути следует использовать стеклянную толстостенную банку с водой, закрывающуюся резиновой пробкой. Пролитую ртуть собирают с помощью стеклянной ловушки с резиновой грушей, а её мельчайшие капельки – ветошью, смоченной 0,1% раствором KMnO_4 , слегка подкисленным HCl . После этого поверхность обрабатывают 20% водным раствором треххлористого железа (FeCl_3) и промывают водой.

Запрещается выливать в раковины, концентрированные растворы щелочей и кислот, органические растворители, легковоспламеняющиеся, горючие и взрывоопасные вещества, щелочные металлы. Все указанные отходы должны обязательно собираться в специальные ёмкости.

Требование безопасности в аварийных ситуациях

В каждом помещении необходимо иметь средства противопожарной защиты. Необходимый минимум первичных средств пожаротушения:

- пенные огнетушители типа ОП-10, ОХВП-10, порошковые огнетушители типа ОП-1, ОП-2Б
- закрывающийся крышкой ящик с сухим просеянным песком вместимостью не менее $0,05 \text{ м}^3$, укомплектованный совком вместимостью не менее 2 кг песка. Вместо ящика песок можно размещать в металлических сосудах вместимостью по 4–6 кг.
- накидки из огнезащитной ткани (1,2 x 0,5 м).

Загорания в помещениях лаборатории необходимо немедленно ликвидировать, при этом:

- легковоспламеняющиеся и горючие жидкости, электропроводку и оборудование, находящееся под напряжением, следует гасить только песком, огнезащитной тканью или порошковыми огнетушителями.
- обесточенные электропроводку и приборы можно гасить водой.

- загорание в вытяжном шкафу ликвидируется первичными средствами пожаротушения только после отключения вентилятора.

Во всех помещениях лаборатории должны быть размещены планы (схемы) эвакуации сотрудников при возникновении пожара и иных чрезвычайных ситуаций, требующих немедленно покинуть помещение.

Недопустимо загромождать проходы и выходы помещений лаборатории, поскольку это может привести к повышенному риску для сотрудников при необходимости срочно покинуть помещение.

Правила безопасности по окончании работы

По окончании работ необходимо проверить отключение электроприборов, закрытие газовых и водопроводных кранов.

Все химические вещества, представляющие опасность должны быть убраны в места их постоянного хранения.

1. Аминокислоты. Белки

1.1. Химическая природа аминокислот и белков

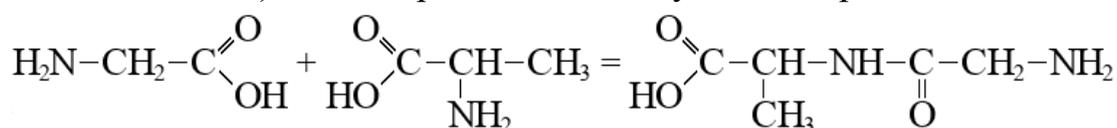
Аминокислоты – органические соединения, производные карбоновых кислот, содержащие амино- и карбоксильную группу. Аминокислоты, кодируемые генетическим кодом и включающиеся в процессе трансляции в белки, называют *протеиногенными*. В основу современной классификации аминокислот положено химическое строение их радикалов. Каждая аминокислота имеет не только своё название (тривиальное и химическое), но и принятое трехбуквенное сокращение, а в латинской графике – однобуквенное обозначение. Например, аланин – ала [А], валин – вал [V], глицин – гли [G].

Аминокислоты являются не только структурными элементами пептидов и белков, но и входят в состав других природных соединений (коферментов, конъюгированных желчных кислот, антибиотиков), а также некоторые аминокислоты являются предшественниками биологически активных веществ (гормонов, биогенных аминов) или важнейшими метаболитами (в процессах глюконеогенеза, биосинтеза и деградации протеиногенных аминокислот, цикла мочевинообразования).

В живых организмах аминокислоты выполняют множеств функций:

- структурные элементы пептидов и белков;
- структурные элементы других природных соединений - аминокислоты и их производные входят в состав коферментов, желчных кислот и др.;
- переносчики сигналов - некоторые из аминокислот являются нейромедиаторами или предшественниками нейромедиаторов, медиаторов и гормонов;
- метаболиты, некоторые аминокислоты принимают участие в обмене веществ, например, служат донорами азота.

Белки представляют собой высокомолекулярные азотсодержащие полимерные органические соединения, построенные из остатков α-аминокислот. Аминокислоты в молекуле белка соединяются между собой *пептидными связями* (-CO-NH-), образуя полипептидные цепи. Пептидная связь возникает между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой, что сопровождается выделением молекулы воды. Образование этой связи между двумя аминокислотами (например, между глицином и аланином) можно представить следующим образом:



При полном гидролитическом расщеплении белковой молекулы происходит разрыв пептидных связей и образование смеси α -аминокислот.

Огромное разнообразие белков в природе определяется их аминокислотным составом и порядком расположения аминокислот в полипептидной цепи.

В белках различают несколько уровней структурной организации, а именно, их первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. *Первичная структура* белка определяется числом и последовательностью аминокислотных остатков, соединенных между собой с помощью пептидных связей. *Вторичная структура* возникает за счет образования водородных связей между группами N – H и O = C данной полипептидной цепи, что приводит к упорядоченному расположению гибкой полипептидной цепи в виде спиральной или складчатой структуры. *Третичная структура* возникает в результате взаимодействия между боковыми цепями аминокислотных остатков полипептидных цепей. К таким взаимодействиям относятся водородные связи, ван-дер-ваальсовы силы, дисульфидные (-S-S-) связи, ионные, появляющиеся между положительно заряженными радикальными аминогруппами диаминомонокрбонных кислот (-NH⁺₃) и отрицательно заряженными радикальными карбоксильными группами дикарбонных аминокислот (-COO) и т.д. В результате таких взаимодействий полипептидная цепь сворачивается очень сложным, но вместе с тем строго определенным образом, приобретая характерную пространственную конфигурацию. И, наконец, межмолекулярные взаимодействия между отдельными полипептидными цепями, обладающими вторичной и третичной структурой, могут приводить к образованию агрегатов, т.е. к возникновению *четвертичной структуры* белка.

Структура белковой молекулы очень лабильна и легко разрушается под влиянием различных физических и химических воздействий, в результате чего изменяются ее биологические и физико-химические свойства.

1.2. Физико-химические свойства белка

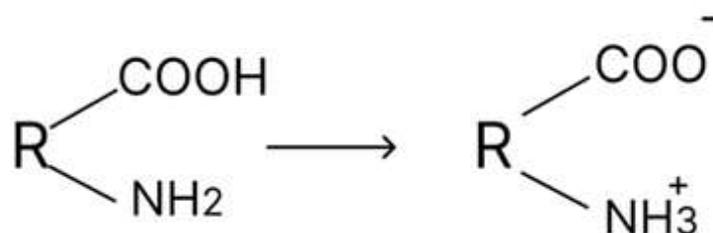
Белки – высокомолекулярные соединения (их молекулярный вес колеблется от нескольких тысяч до десятков миллионов), большинство их обладает гидрофильными свойствами, т.е. они имеют большое сродство к воде.

По современным представлениям растворы белков являются истинными растворами. Поскольку размер белковых молекул соответствует размерам коллоидных частиц (0,1-0,001 мкм), то растворы белка обладают свойствами коллоидных растворов. В отраженном свете они опалесцируют,

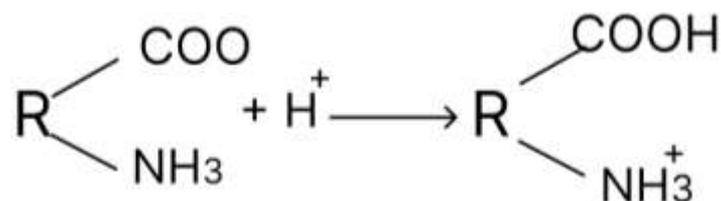
дают эффект Тиндаля (при боковом освещении виден светящийся конус), частицы белка не способны проникать через полупроницаемые мембраны.

Коллоидные растворы белка достаточно устойчивы. Такая стабильность белковых растворов обусловлена двумя факторами: во-первых, белковая частица несет электрический заряд и, во-вторых, вокруг белковой молекулы образуется плотная водная оболочка, состоящая из нескольких слоев, что препятствует коагуляции (объединению) белковых молекул и выпадению их в осадок. Присутствие водной оболочки объясняется наличием на поверхности белковой молекулы большого количества гидрофильных полярных групп, связывающих частицы воды.

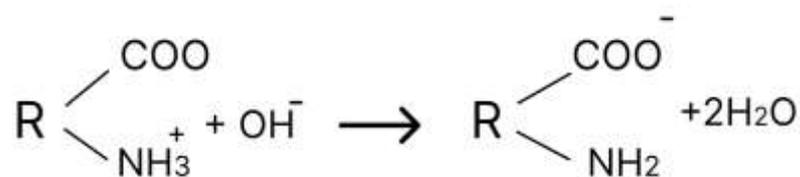
Наличие электрического заряда обусловлено способностью белковой молекулы диссоциировать в водных растворах и давать ионы. Белки, как и их структурные элементы — аминокислоты, благодаря одновременному присутствию COOH-групп (кислотных) и NH₂-групп (основных), являются амфолитами (амфотерными электролитами):



В кислой среде они проявляют основные свойства и несут положительный заряд (катионы):



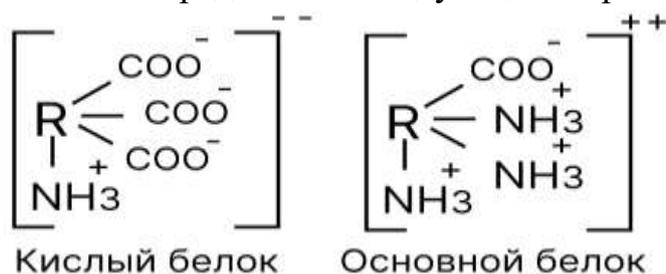
В щелочной среде они проявляют кислотные свойства, и несут отрицательный заряд (анионы):



Поскольку белки имеют различный аминокислотный состав, то в зависимости от преобладания в молекуле белка дикарбоновых аминокислот (глутаминовой, аспарагиновой) или диаминомонокрбоновых аминокислот (лизина, аргинина) белки в водных растворах обладают соответственно, свойствами слабых кислот или слабых оснований, Большинство природных белков имеют кислотный характер (альбумины, глобулины) и в водном

растворе несут отрицательный заряд; основные белки (протамины, гистоны) в водном растворе несут положительный заряд.

Схематически это можно представить следующим образом:



При добавлении кислоты к водному раствору белка его кислотная диссоциация понижается согласно закону действия масс, основная же диссоциация соответственно повышается. Наступает момент, когда кислотная диссоциация делается равной основной; общий заряд белковой молекулы при этом становится наименьшим, так как в этом случае белковая частица несет на себе равное количество положительных и отрицательных зарядов, уравновешивающих друг друга. При дальнейшем добавлении кислоты кислотная диссоциация белка еще больше подавляется и белок приобретает положительный заряд (катион); таким образом, происходит перезарядка коллоидных частиц. Наоборот, при действии щелочей понижается основная и усиливается кислотная диссоциация и белок заряжается отрицательно. Такое значение рН, при котором частицы белка несут равное количество положительных и отрицательных зарядов (белок находится в изоэлектрическом состоянии), называется *изоэлектрической точкой*. В изоэлектрической точке белок легко выпадает в осадок. Это можно объяснить тем, что в изоэлектрическом состоянии белок лишается одного из стабилизирующих факторов и вследствие снятия заряда прекращается взаимоотталкивание частиц; под влиянием межмолекулярных сил притяжения таких частиц образуют крупные агрегаты и выпадают в осадок.

Осаждение белка из раствора может быть достигнуто многими разнообразными приемами. Реакция осаждения пользуются для обнаружения белка в растворе для разделения белковых фракций, а также для получения безбелковых фильтратов.

Коагуляция - сближение и склеивание белковых частиц, в результате чего они увеличивается в размере и легко выпадают в осадок. В изоэлектрическом состоянии у белков резко снижается степень диссоциации и частицы становятся электронейтральными. При этом создаются условия для разрушения гидратационной оболочки белков, что вместе с потерей заряда способствует их коагуляции.

Явление коагуляции будет обратимым, если при устранении факторов коагуляции белок-коллоид снова возвратиться к своему первоначальному состоянию. Но иногда наблюдается необратимая коагуляция, при которой коагулированный белок в свое первоначальное состояние возвратиться не может.

Температурная коагуляция белков. При подогревании растворов белка выше 60°C белки коагулируют, легко этот процесс протекает в изоэлектрической точке. При этом разрушается гидратационная оболочка белковой частицы и третичная структура молекулы белка теряет гидрофильность, становится гидрофобной и легко осаждается. Белок в изоэлектрическое состояние можно привести добавив небольшое количество электролита.

Коагуляция белков солями тяжелых металлов. Соли тяжелых металлов (Cu, Pb, Ag и др.) в небольших концентрациях способны вызывать коагуляцию белков в их растворах. Ионы взаимодействуют с белками и образуют нерастворимые в воде комплексы, при этом подавляется электрический заряд коллоидной частицы и нарушается вторичная и третичная структура белковых молекул. Коагуляции белков под давлением ионов тяжелых металлов и под действием высокой температуры - процесс необратимый.

Коагуляция белков минеральными и органическими кислотами. Коагуляцию белка можно вызвать с помощью концентрированных растворов минеральных кислот (азотная, серная, соляная). Применение этих коагулянтов вызывает необратимое осаждение белков. Механизм действия сводится к подавлению электрического заряда, дегидратации и частичного гидролиза белковой частицы.

Некоторые органические кислоты, в частности сульфосалициловая, трихлоруксусная и пикриновая, способны необратимо осаждают белки из растворов. Механизм их действия похож на механизм минеральных кислот. Необратимое осаждение белка можно вызвать фенолом, ацетоном и в определенной степени спиртом.

Высаливание белков. В отличие от изложенного под влиянием солей щелочных металлов (NaCl , Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, NH_4Cl и др.) происходит обратимая коагуляция и осаждение белков, которое называется высаливанием. Механизм этой коагуляции состоит в том, что приведенные электролиты нейтрализуют электрический заряд коллоидных частиц белка и разрушают их гидратационную оболочку. Эти факторы обеспечивают выпадение белка в осадок. При разбавлении водой белковых растворов, которые коагулировали под влиянием солей щелочных металлов, белок снова

переходит в растворенное состояние (золь). Осадок белка можно освободить от солей методом диализа и получить белок в очищенном виде.

Различные белки высаливаются при разных концентрациях солей, что положено в основу метода разделения белков на фракции и получение их в кристаллическом виде. Для этой цели к раствору белка добавляют осадитель до тех пор, пока раствор помутнеет. Затем раствор оставляют, но постепенно увеличивают концентрацию того же электролита при определенном значении рН и температуры.

Осадок белка приобретает аморфный вид, затем постепенно начинает кристаллизоваться и приобретает форму кристаллов. Кристаллические белковые препараты являются наиболее чистыми белками, которые используются для изучения структуры, физико-химических и биологических свойств.

Денатурация белков. Под влиянием высоких или низких температур, изменений рН, действия ионов тяжелых металлов и некоторых химических веществ в молекулах белков происходят изменения, называемые денатурацией. Проявлением денатурации глобулярных белков является уменьшение их растворимости и выпадение в осадок. У многих белков денатурация наступает при нагревании их до 50-60 °С, а у некоторых при охлаждении до температуры ниже 10-15 °С. Примером тепловой денатурации служит свертывание белка при варке яиц.

При денатурации белки теряют свою биологическую активность. Ферменты при нагревании теряют способность катализировать химические реакции. При денатурации ковалентные связи пептидного остова белка не разрываются, но третичная структура белковой молекулы разворачивается до полипептидной цепочки. В денатурированном состоянии полипептидные цепи образуют случайные и беспорядочные петли и клубки, причем конформация в течение времени может изменяться.

Денатурация не всегда является необратимым процессом. Денатурированные молекулы приобретают свою первоначальную форму в результате процесса, называемого ренатурацией. Если денатурированный белок был ферментом, то в процессе ренатурации его каталитическая активность также может полностью восстановиться. Следовательно, в процессе ренатурации восстанавливается исходная биологическая активность с прежними характеристиками.

1.3. Классификация белков

В основу современной классификации белков положено несколько признаков, которые в достаточной мере характеризуют эти вещества:

химический состав, форма белковых молекул, физико-химические свойства, происхождение и биологические особенности. Один из признаков - химическая структура белковых молекул.

По химическому строению белки разделяются на **простые (протеины)** и **сложные (протеиды)**. Простые белки состоят только из аминокислот, а сложные при гидролизе распадаются на аминокислоты и различные вещества небелкового характера. Однако, такое разделение белков условно. Например, простые белки - альбумины, глобулины и некоторые другие - могут содержать углеводный или липидный компоненты. К сложным белкам относятся такие, у которых небелковая частица в значительной мере определяет характер структуры и биологическое действие белка, например, гем в гемоглобине или нуклеиновая кислота в составе нуклеопротеида.

Простые белки. К группе простых белков относят альбумины, глобулины, гистоны, протамины, протеиноиды, глютелины и проламины.

Альбумины - наиболее распространенная группа белков, они встречаются во всех тканях животных и растений, хорошо растворимы в воде и ненасыщенных солевых растворах. Альбумины - высокодисперсные и гидрофильные белки, что обеспечивает стойкость коллоидных растворов этих веществ. В зависимости от происхождения их называют сероальбумины (сыворотка крови), лактоальбумины (молоко), овоальбумины (яичные белки) и др. Альбумины характеризуются высоким содержанием аминокислоты лейцина (до 15 %) и очень низким количеством глицина. Молекулярная масса альбуминов колеблется от 35 000 до 70 000, а изоэлектрическая точка лежит при $pH = 4,6 - 4,7$. Многие из альбуминов получены в кристаллическом виде (бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин и др.).

Глобулины - наиболее многочисленная группа белков в организме животных (известно более двадцати индивидуальных глобулинов в сыворотке крови). Они нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в разбавленных солевых растворах и щелочах. Это крупнодисперсные белки, они меньше гидратированы и менее устойчивы в виде коллоидов по сравнению с альбуминами. Глобулины выпадают в осадок при действии 30-50%-ной концентрации сульфата аммония. Среди глобулинов различают сывороточный, молочный, яичный, мышечный и другие глобулины. По аминокислотному составу глобулины похожи на альбумины, но отличаются от них высоким содержанием глицина (3-4 %).

Некоторые глобулины в организме животных играют роль защитных белков против инфекционных болезней. Из глобулинов образуются антитела, а белок фибриноген необходим для свертывания крови, т. е. выполняет защитную функцию против кровопотерь. Соотношение альбуминов и

глобулинов в крови в норме сохраняется на постоянном уровне, но при многих заболеваниях отношение изменяется. Определение белкового коэффициента в крови больных животных может представлять клинический интерес.

Гистоны - группа ядерных белков, в состав молекул которых входит от 20 до 30 % диаминомонокислот (лизин, аргинин) и циклической аминокислоты - гистидина. Это белки со щелочными свойствами, так как из двух аминогрупп при построении белковой молекулы только одна (альфа-аминогруппа) используется для образования пептидной связи. Вторая аминогруппа остается в белковой молекуле свободной, и это обуславливает щелочные свойства гистонов.

Гистоны в значительной степени обуславливают уникальную структуру ДНК и дезоксирибонуклеопротеидов в ядре, что служит необходимым условием для биосинтеза белков. Гистоны вместе с протаминами являются регуляторами синтеза белков в организме.

Протамины - белки, отличающиеся высоким содержанием диаминомонокислот (от 50 до 80 %), молекулярная масса их не превышает 10000. В протаминках содержится наибольшее количество аргинина и 6-8 других аминокислот, т. е. это простейшие белки. Щелочной характер протаминов выражен в большей степени, чем у гистонов. Протамины составляют белковую часть нуклеопротеидов.

Протеиноиды (склеропротеины). Под этим названием объединяют белки опорных тканей - костей, хрящей, сухожилий, связок, шерсти, волос, копыт, шелка и др.

Отличительная особенность белков опорных тканей - нерастворимость их в воде, солевых растворах, разведенных кислотах и щелочах, что обеспечивает возможность осуществления этими белками опорной функции. Они плохо или совсем не гидролизуются ферментами пищеварительного тракта. Протеиноиды относятся к фибриллярным белкам, частицы которых имеют форму вытянутых волокон, встречаются почти всегда в твердом виде, состоят почти исключительно из моноаминомонокислот, богаты глицином, пролином и цистином. В их составе нет или почти нет таких аминокислот, как фенилаланин, тирозин, триптофан, гистидин, метионин и треонин. Из отдельных белков этого типа интерес представляют коллаген, проколлаген, эластин и кератины.

Коллаген относится к структурным белкам соединительной ткани. Он принимает участие в формировании основной части сухожилий, связок и капсул суставов, а также входит в состав кожи, хрящей и костей. Молекула коллагена не содержит цистина, цистеина и триптофана, тирозин и метионин

обнаруживаются в небольших количествах. Примерно на 50 % коллаген состоит из глицина, пролина и оксипролина. Минимальная молекулярная масса коллагена 40000. При длительном нагревании коллагена в воде он растворяется и необратимо превращается в водорастворимое вещество - желатин.

Проколлаген - генетический предшественник коллагена. Он выделен в кристаллическом виде, отличается от коллагена аминокислотным составом и способностью гидролизоваться до аминокислот ферментами желудочно-кишечного тракта.

Эластин - структурный белок всех связок и сухожилий, особенно много этого белка в стенках сосудов и в вейной связке крупного рогатого скота. По своим свойствам эластин напоминает коллаген, но отличается от последнего способностью гидролизоваться под влиянием ферментов пищеварительного сока. Эластин содержит много глицина и значительно меньше аминокислот - пролина и оксипролина.

Кератины образуются в эпидермисе кожи, входят в состав волос, шерсти, перьев, рогов и копыт. К кератинам относят нейрокератин нервной ткани, яичный кератин и кератиноподобное вещество зоба и мускульного желудка птиц. В составе молекул кератинов много содержится цистина, лейцина и глютаминовой кислоты. Минимальная молекулярная масса кератинов 2000000. Отдельные кератины могут содержать 3540 полипептидных цепей с молекулярной массой не менее 55000 каждая. Многие кератины способны набухать и сжиматься. Например, шерсть необратимо «садится» в горячей воде за счет разрушения солевых мостиков и водородных связей под влиянием высокой температуры.

Сложные белки. Сложными белками называются белки, которые, кроме белковой части, содержат небелковый компонент, называемый простетической группой. В зависимости от химической природы простетической группы сложные белки делятся на нуклеопротеиды, хромопротеиды, фосфопротеиды, гликопротеиды, мукопротеиды.

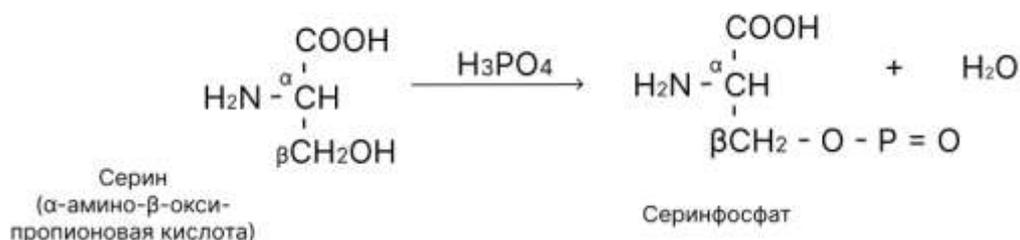
Нуклеопротеиды встречаются главным образом в ядрах клеток в небольшом количестве в цитоплазме. В животных организмах наиболее богаты нуклеопротеидами такие органы, как селезенка, печень, почки и др. Из растительных объектов особенно богаты нуклеопротеидами дрожжи.

Хромопротеидами называются сложные белки, у которых простетической группой является какое-либо окрашенное соединение небелкового характера, как, например, гем, каратиноиды, флавины и др.

Хромопротеиды широко распространены в животном и растительном мире и играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах

организма. Особенно распространенными являются хромопротеиды геминной природы. К ним относятся гемоглобин крови, миоглобин или миохром мышечной ткани, некоторые ферменты растительного и животного происхождения, как, например, каталаза, пероксидаза, цитохромы и др.

Фосфопротеидами называются белки, которые содержат фосфорную кислоту (0,5 - 0,9 %), связанную, как полагают, с молекулами оксиаминокислот по типу сложных эфиров:



Фосфопротеиды нерастворимы в воде, но растворимы в разбавленных щелочах, осаждаются при подкислении или при полунасыщении сернокислым аммонием. К фосфопротеидам относятся: казеин молока, вителлин яичного желтка, ихтулин рыбьей икры и некоторые другие белки.

По химической природе гликопротеиды представляют собой сложные белки, состоящие из белкового компонента и полисахарида. При гидролизе белковый компонент распадается на аминокислоты, а полисахарид — на гексозы, гексозамины и глюкуроновые кислоты.

Гликопротеиды содержатся почти во всех тканях и жидкостях организма и носят общее название муцинов и мукоидов. Муцины встречаются в секретах слизистых желез. Мукоиды входят в состав костной, хрящевой, соединительной ткани.

Гликопротеиды нерастворимы в воде, хорошо растворяются в щелочах и осаждаются при подкислении. Растворы гликопротеидов не свертываются при кипячении.

1.4. Классификация и функции растительных белков

Первые попытки классифицировать растительные белки были основаны на их экстрагируемости и растворимости. Первое систематическое исследование белков, запасаемых в семенах, было проведено Т.Б. Осборном с использованием схемы классификации, предложенной Американским комитетом по номенклатуре белков. Согласно этой номенклатуре, белки делятся на три типа: простые, конъюгированные и производные. Белки во всех растительных тканях относятся к простым белкам, которые, в свою очередь, делятся на четыре типа (табл. 2). Эти четыре типа растительных белков в основном связаны с белками, запасенными в семенах, и известны

как альбумины, глобулины, проламины и глютелины. Они были выделены методом фракционирования по Осборну с использованием воды, соли, спирта и щелочи соответственно. Позднее были предприняты попытки более сложной классификации растительных белков, например, на основе их химической структуры, механизма/механизмов действия, биологической функции или расположения в растении. Несмотря на попытки создать более современные системы классификации, классификация Осборна по-прежнему является наиболее широко используемой системой, особенно при экстракции и очистке белков.

Таблица 2 – Типы, характеристики (на основе фракционирования по Осборну) и наличие растительных белков

Тип белка	Растворимость	Характеристики	Примеры на растениях
Альбумины	Вода	Шаровидные, коагулируемые при нагревании	2S-тип; например, лейцин, легумалин, фазелин, рицин
Глобулины	Солевой раствор	Глобулярные белки с более высокой молекулярной массой, чем альбумины	7S вицилинового типа (горох, соя и т.д.) 11S бобового типа (капустные, овес, рис)
Проламины	Смеси спирта и воды (например 70% этанола)	Внутримолекулярные дисульфидные связи, высоко содержание пролина и глутамина, повторяющиеся мотивы в центральных доменах	Глютамин, Зейн, Хордеин и Секалин
Глютелины	Щелочные растворы	Межмолекулярные дисульфидные связи, высокое содержание пролина и глутамина, повторяющиеся мотивы в	Глютенины в пшенице

		центральных доменах	
--	--	------------------------	--

Однако на практике классификация Осборна применяется только к запасным белкам семян, в то время как классификация других растительных белков, как правило, более сложная и иногда неясная.

Альбумины – это водорастворимые глобулярные белки, которые сворачиваются при нагревании. Наиболее известными альбуминами являются сывороточный альбумин, основной белок в крови человека, и яичный белок. В растениях альбумин присутствует в виде запасного белка 2S альбумина в семенах, например, в виде лейцина в ячмене, пшенице и ржи, в виде легумелина в горохе, сое и вигнее, в виде фазелина в фасоли и виде рицина в клещевине. Многие белки в тканях зеленых растений, в том числе рибулозо-1,5-бифосфат-карбоксилаза-оксигеназа (RuBisCO), фермент, катализирующий первый этап фиксации углерода, и самый распространенный белок на Земле, не относятся к альбуминам несмотря на то, что они растворимы в воде. RuBisCO растворима в воде и коагулирует при нагревании, что, согласно определению Осборна, должно делать ее альбуминоподобным белком. Точно также большинство ферментативных белков в растениях растворимы в воде и сворачиваются при нагревании, но, помимо того, что они являются ферментами, они не относятся ни к одному из известных типов белков.

Глобулины – это также глобулярные белки, которые имеют более высокую молекулярную массу, чем альбумины, и растворимы в разбавленном солевом растворе, но не растворимы в воде. В растениях глобулины присутствуют в качестве запасных белков как у двудольных, так и у однодольных растений, что делает их наиболее распространенной группой запасных белков. В зависимости от коэффициента седиментации запасные глобулины растений в основном делятся на две группы: 7S-вицилин, который был обнаружен и тщательно изучен в горохе, соевых бобах и т.д., и 11S-легумин, который является основным запасным белком в большинстве бобовых и двудольных растений, таких как капуста, овес и рис. Некоторые белки в листьях растений явно не растворяются в воде и могут быть классифицированы как глобулины в некоторых характеристиках белков в листьях. Однако причина, по которой эти листовые белки не растворяются в воде, может заключаться в том, что они связаны с клеточной стенкой, взаимодействуют с пектином или являются гидрофобными, и поэтому их, очевидно, нельзя отнести к глобулинам или альбуминам.

Два дополнительных типа белков, проламины и глютелины, содержатся, в частности, в качестве запасных белков в семенах злаковых (Triticeae), где они

являются доминирующими белками, составляют до 85% от общего количества белка. Проламины, содержащиеся в пшенице, называются глиадами, а номенклатура проламинов в других злаковых основана на их латинских названиях: зеин в кукурузе, гордеин в ячмене, секалин в ржи и т.д. Чаще всего глютелин содержится в пшенице (глютенин), хотя глютелины также присутствуют в ячмене и ржи. Проламины и глютелины имеют ряд общих черт, в том числе высокое содержание пролина и глутамина, а также большое количество повторяющихся мотивов или последовательности с неповторяющимися доменами на N- и C-концах. Несмотря на то, что эти белки различаются по молярной массе, основное различие между двумя типами белков заключается в образовании внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей в нативном состоянии проламинов и глютелинов соответственно, что объясняет различия в их экстрагируемости.

1.5. Цветные реакции на белки и аминокислоты

Присутствие белка в биологических объектах или растворах можно обнаружить с помощью цветных реакций, которые обусловлены наличием аминокислот в белке, их специфическими группами или пептидными связями.

Ряд химических веществ дает окрашенные продукты реакции при взаимодействии с белками. Эти реакции применяются для качественного и количественного определения белка и присутствующих в нем аминокислот.

Существуют универсальные цветные реакции, которые дают все белки (биуретовая и нингидриновая). Кроме того, имеются специфические реакции, которые обусловлены наличием только определенных аминокислот в молекуле белка (ксантопротеиновая, Миллона, Фоля и др.); ряд аминокислот можно открыть указанными реактивами и в чистых растворах аминокислот. На основании некоторых цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот, которые широко используются в биохимических лабораториях.

Биуретовая реакция

Метод основан на способности пептидной группы белков и полипептидов образовывать в щелочной среде с ионами меди (II) комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком. Биуретовая реакция положительна на производное мочевины биурет -NH₂-аспарагин – в достаточно больших концентрациях. Реакция протекает по

следующей схеме (пептидная связь в щелочной среде присутствует в таутомерной енольной форме):

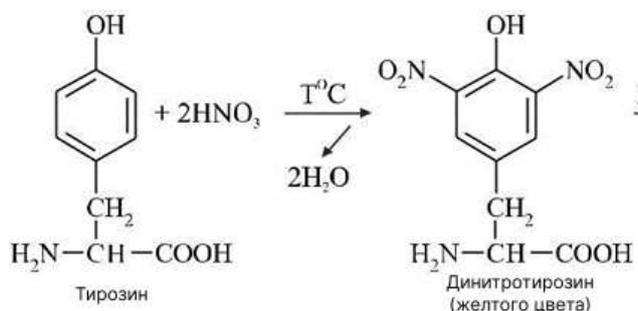
Интенсивность окраски комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе.

Ход работы. В пробирку вносят 1 мл раствора яичного белка, 1-2 мл 10 %-ного раствора NaOH и 1-2 капли раствора сернокислой меди. При взбалтывании появляется фиолетовое окрашивание. Такой же опыт проделывают, заменив NaOH водой.

Ксантопротеиновая реакция

При добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты белок сначала выпадает в осадок, а затем при нагревании растворяется и жидкость окрашивается в желтый цвет. Эта реакция называется ксантопротеиновой; она указывает на присутствие в белке ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана) и основана на образовании нитропроизводных этих аминокислот.

Реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот, которые при обработке концентрированной азотной кислотой подвергаются нитрованию:



Нитропроизводные аминокислот в щелочной среде образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.



Аналогично протекает реакция нитрования триптофана и фенилаланина (последний нитруется труднее). Ксантопротеиновую реакцию

дают почти все белки; исключение составляют клупеин и сальмин (из группы протаминов и желатина), в молекуле которых почти полностью отсутствуют ароматические аминокислоты.

Ход работы. К 1 мл раствора яичного белка приливают под пою 5-6 капель концентрированной азотной кислоты. Выпадает осадок, который при подогревании приобретает желтую окраску. После охлаждения в пробирку по каплям добавляют 10 %-ный раствор гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания.

Нингидриновая реакция

Белки, полипептиды, а также свободные α -аминокислоты дают синее окрашивание с нингидрином (трикетогидриндегидратом). Реакция обусловлена наличием α -аминокислот в молекуле белка.

При нагревании белка с водным раствором нингидрина аминокислоты окисляются и распадаются, образуя двуокись углерода, аммиак и соответствующий альдегид:

Восстановленный нингидрин конденсируется с аммиаком и окисленной молекулой нингидрина, образуя краситель типа мурексида фиолетово-синего цвета.

Ход работы. Готовят три чистые сухие пробирки. В 1-ую пробирку наливают 1 мл 1% раствора белка, во 2-ю 1 мл гидролизата белка, в 3-ю -1 мл 2% раствора белка. Во все три пробирки добавляют по 1 мл 0,1% водного раствора нингидрина и кипятят 1-2 мин. Во всех пробирках появляется розовое, красное, а затем синее окрашивание.

Реакция Адамкевича

При добавлении к раствору белка незначительных количеств глиоксалевого кислоты в ($C_2H_2O_3$) присутствии концентрированной серной кислоты получается красно-фиолетовое окрашивание. Эта реакция связана с наличием в молекуле белка аминокислоты триптофана и основана на способности триптофана в кислой среде вступать в реакцию с альдегидами, образуя при этом окрашенные продукты конденсации.

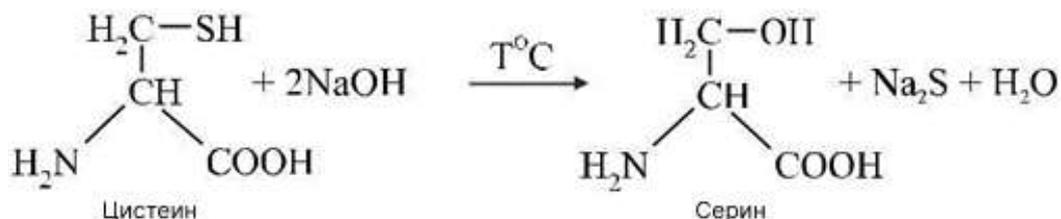
Глиокселевая кислота всегда присутствует в небольших количествах в ледяной уксусной кислоте, поэтому последнюю используют в реакции как источник глиокселевой кислоты:



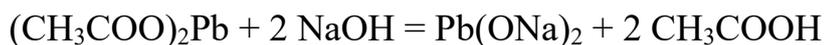
Ход работы. К 1 мл раствора яичного белка приливают 1 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивают и осторожно нагревают до растворения выпавшего осадка белка, после чего содержимое пробирки охлаждают. Очень осторожно, наклонив пробирку, по стенке прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты (следя за тем, чтобы жидкости не смешивались). На границе двух слоев появляется красно-фиолетовое кольцо, которое постепенно растворяется в растворе.

Реакция Фоля

При добавлении к раствору белка гидроксида натрия, уксуснокислого свинца с последующим кипячением раствор начинает темнеть. Реакция обусловлена присутствием в белке содержащих аминокислот: цистина, цистеина и метионина. Эти аминокислоты при нагревании в присутствии крепкой щелочи разрушаются, образуя сернистый натрий:



Уксуснокислый свинец реагирует со щелочью с образованием плумбита натрия:



Сернистый натрий при взаимодействии с плумбитом образует черный осадок сернистого свинца:



Черный осадок

Ход работы. К 1 мл 1% раствора яичного белка прилить 2-3 мл раствора гидроксида натрия и вскипятить. В горячий раствор добавить

небольшое количество уксусного свинца. Раствор темнеет вследствие образования сульфида свинца.

1.6. Методы осаждения и коагуляция белков

Реакции осаждения белков

Для осаждения белка нужно лишить его факторов, удерживающих его в растворе, используя различные агенты, снижающие заряд или разрушающие гидратную оболочку белковой частицы.

При изучении реакций осаждения белка следует познакомиться с понятием *денатурации*. Белки под влиянием изменения рН, повышения температуры, излучения различных длин волн, радиоактивного излучения, а также ряда химических веществ (органические растворители, тяжелые металлы и др.) претерпевают глубокие изменения в пространственной нативной структуре молекулы, в результате которых теряется способность белка растворяться в обычных для них растворителях (вода, солевые растворы и др.). Белки при этом теряют свои гидрофильные свойства и приобретают гидрофобные. Пептидные связи в белках при денатурации не гидролизуются.

Фактически процесс денатурации белка сводится к разрушению нативной вторичной и третичной структуры белка, при этом белковая молекула, как правило, теряет свои биологические свойства.

Реакции осаждения белков весьма разнообразны, однако их можно разделить на две группы:

практически необратимые реакции осаждения, при которых белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе. В этом случае наступает денатурация белка. К необратимым реакциям относятся осаждение белка тяжелых металлов алкалоидными реактивами, минеральными и органическими кислотами и осаждение при нагревании.

обратимые реакции осаждения, при которых осаждаемые белки не подвергаются глубоким изменениям и поэтому получаемые осадки белков могут быть растворены в первоначальном растворителе. Молекула белка при этом сохраняет свои первоначальные нативные, включая биологические, свойства и не подвергается заметной денатурации.

К обратимым реакциям осаждения следует отнести осаждение белков органическими растворителями (спиртом или ацетоном) и высаливание белков (осаждение под влиянием концентрированных растворов нейтральных солей: NH_4Cl , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и др.).

Осаждение белка при нагревании

Почти все белки денатурируют при нагревании (50-55 °C и выше). Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате которой белок теряет свои нативные свойства, уменьшается его растворимость (уменьшение гидрофильных свойств ведет к нарушению гидратной оболочки). Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в выпадении в осадок денатурированного при нагревании белка. Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке белка, т.е. при такой величине pH, когда коллоидные частицы белка являются наименее устойчивыми. Поэтому для полного осаждения белка при нагревании следует создавать реакцию среды, соответствующую его изоэлектрической точке.

Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждают в слабокислой среде, белки, обладающие щелочными свойствами - в слабощелочной среде.

В сильнокислых (за исключением азотной, трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот) и сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок не выпадает в осадок, так как его частицы перезаряжаются (или происходит усиление имеющегося заряда) и несут в первом случае положительный, во втором случае отрицательный заряд, что повышает их устойчивость в растворе в результате электростатических сил отталкивания. Поэтому в сильнокислых и сильнощелочных растворах белки обычно не выпадают в осадок при нагревании. Однако, в сильнокислых растворах белки при нагревании могут коагулировать при добавлении достаточного количества какой-либо нейтральной соли. Степень влияния ионов нейтральных солей на осаждаемость белка зависит от их способности адсорбироваться на частицах белка. Адсорбированные ионы соли (если они противоположны по знаку заряду коллоидной частицы) нейтрализуют заряд частицы; наступает момент, когда силы притяжения между молекулами превышают силы отталкивания, и белок выпадает в осадок.

Ход работы. В четыре пронумерованные пробирки наливают по 2 мл раствора яичного белка. Содержимое первой пробирки нагревают и наблюдают, через какой промежуток времени образуется осадок.

Во вторую пробирку добавляют 1 каплю 0,2 М раствора уксусной кислоты и также нагревают. В этой пробирке осадок выпадает быстрее и более обильный, чем в первой, так как белок во второй пробирке находится ближе к изоэлектрической точке, чем в первой пробирке.

В третью пробирку добавляют 1 каплю концентрированной уксусной кислоты и нагревают. В данном случае осадок белка не образуется не только

при нагревании, но и при кипячении. Этот факт объясняется тем, что белок сильно заряжен, его мицеллы несут положительный заряд (являются катионами). Одноименно заряженные молекулы отталкиваются одна от другой, что стабилизирует раствор.

В четвертую пробирку добавляют 0,5 мл раствора гидроксида натрия и нагревают. В этом случае осадок также не образуется не только при нагревании, но и при кипячении; белок отрицательно заряжен, его мицеллы являются анионами. Таким образом, ни катионы, ни анионы белка при нагревании и кипячении в осадок не выпадают.

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами (кроме H_3PO_4) объясняется как тлениями дегидратации белковых частиц и нейтрализации⁷ их зарядов, так и рядом других причин (например, денатурацией, образованием солей и др.). В избытке серной или соляной кислот, а также при их длительном воздействии выпавший осадок денатурированного белка растворяется, по-видимому, за счет пере зарядки белка и частичного гидролиза. В избытке азотной кислоты этого растворения не происходит (точный механизм этого явления не установлен; возможно, что ион NO_3 мешает перезарядке белковой молекулы). Реакция осаждения белка азотной кислотой используется при клинических исследованиях мочи на присутствие и количественное содержание в ней белка.

Ход работы. В пробирку наливают 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно, держа пробирку под углом 45°, наклоняют 1 мл раствора яичного белка. На границе двух слоев жидкостей образуется белое кольцо.

Осаждение белка солями тяжелых металлов

При действии солей тяжелых металлов на растворы белка происходит денатурация белковой молекулы. Осаждение денатурированного белка обусловлено адсорбцией тяжелого металла на поверхности белковой молекулы и образованием нерастворимых комплексов.

Свойства белков связывать тяжелые металлы используются в медицинской практике; белки применяют в качестве противоядия при отравлении солями ртути, свинца, меди и другими металлами. Белок ограничивает всасывание тяжелого металла, образуя с ним нерастворимые, комплексы.

Следует отметить, что при осаждении белков некоторыми солями тяжелых металлов, например, уксуснокислым свинцом и сульфатом меди, избыток этих солей ведет к растворению (пептизации) первоначально

образовавшегося осадка, что связано с адсорбцией тяжёлого металла на поверхности коллоидных частиц и проявлением положительного заряда на молекуле белка. При избытке солей серебра и ртути пептизации не наблюдается.

Ход работы. В пробирку вносят 1 мл 1 %-ного р-ра яичного белка и приливают 1-2 капли раствора сульфата меди. Выпадает осадок, не — растворяющийся при добавлении воды.

Определение изоэлектрической точки белков

Изоэлектрической точкой белка называется определенная величина pH среды, при которой белок находится в виде нейтральных молекул (в изоэлектрическом состоянии), несущих равные количества положительных и отрицательных зарядов. При других концентрациях ионов водорода в растворе имеются преимущественно положительные или отрицательные ионы белка. Растворы белков в изоэлектрической точке (ИЭТ) наименее устойчивы и легко выпадают в осадок. Для большинства белков изоэлектрическая точка близка к нейтральной среде, но не вполне совпадает с ней; для многих белков она сдвинута в кислую сторону, а некоторые белки имеют изоэлектрическую точку при слабощелочной реакции среды.

Метод основан на способности растворенного белка в ИЭТ переходить в неустойчивое состояние и выпадать в осадок, что проявляется в помутнении раствора. При добавлении этилового спирта (водоотнимающего средства) процесс осаждения белка ускоряется.

Определение изоэлектрической точки белка может быть сведено к определению pH раствора, при котором наблюдается наиболее быстрое и полное выпадение белка в осадок. Для получения растворов с различной величиной водородного показателя пользуются буферными растворами.

Ход работы. Для определения ИЭТ альбумина в 6 сухих пробирках готовят буферные смеси с разным значением pH в количествах, указанных в таблице 3.

Таблица 3 – Приготовление буферных систем для ИЭТ

№ пробирки	Состав буферной смеси, мл		pH
	0.2 М CH_3COOH	0.2 М CH_3COONa	

При смешивании растворов в каждой пробирке устанавливается определенная концентрация ионов водорода (pH). В каждую пробирку добавляют по 0.5 мл 0,1%-ного раствора яичного белка, встряхивают и отмечают помутнение раствора.

Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл этилового спирта и также оценивают степень помутнения. Результаты заносят в таблицу 2. Оценивая степень мутности раствора до и после добавления спирта по 5-балльной шкале: 1-отсутствие помутнения; 2-слабое помутнение; 3- умеренное помутнение; 4-сильное помутнение; 5-очень сильное помутнение (заполнить таблицу 4).

Таблица 4 – Определение ИЭТ белков

рН	Степень мутности раствора альбумина	
	До добавления спирта	После добавления спирта

Нахождение ИЭТ для индивидуальных белков позволяет подобрать условия для осаждения их из биологических объектов.

1.7. Методы количественного определения белков

Количественное определение белка по биуретовой реакции

Метод основан на измерении интенсивности окраски, которую дает раствор белка при взаимодействии со щелочным раствором медного купороса, образуя биуретовый комплекс. Интенсивность окрашивания пропорциональна содержанию пептидных связей, а, следовательно, и концентрации белка в растворе.

Для определения содержания белка в исследуемом образце необходимо построить калибровочную кривую. Для построения калибровочной кривой готовят ряд растворов с известными концентрациями. В серию пробирок вливают соответственно 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 0,1 мл 1 % раствора кристаллического альбумина сыворотки крови, приготовленного на 0,9 % растворе $NaCl$ и содержащего от 1 до 10 г белка, доводят объем раствора 0,9 % раствором $NaCl$ до 1 мл, перемешивают, добавляют в каждую пробирку по

4 мл биуретового реактива. Отдельно готовят контрольный раствор. Для этого в пробирку наливают 1 мл 0,9 % раствора $NaCl$ и 4 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок энергично встряхивают.

Через 30 мин измеряют экстинкцию каждой пробы на фотоэлектроколориметре относительно контрольного раствора в кювете толщиной 1 см при длине волны 540-560 нм (зеленый светофильтр). По полученным данным строят калибровочную кривую (рис. 1).

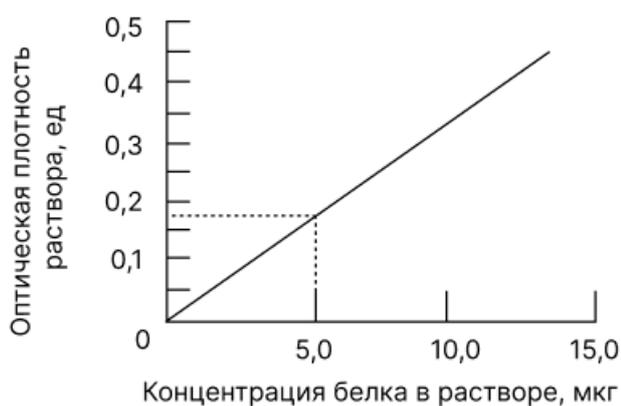


Рис. 1. Калибровочная кривая, построенная по стандартным растворам белка.

1.8. Хроматографический анализ аминокислот

Разделение аминокислот методом хроматографии на бумаге проводится с целью идентификации аминокислот, находящихся в растворе. Метод основан на различной растворимости отдельных аминокислот в двух частично смешивающихся жидкостях.

С помощью распределительной хроматографии легко осуществляется разделение аминокислот и определение их в смеси. Метод заключается в том, что каплю смеси аминокислот или гидролизата белка наносят на полоску фильтровальной бумаги, конец которой опускают на подходящий органический растворитель. Растворитель насыщается полоской фильтровальной бумаги и увлекает за собой нанесенные на бумагу аминокислоты. Скорость перемещения аминокислот на бумаге зависит от химического строения аминокислот и от их способности растворяться в подвижном и неподвижном растворителе. В качестве подвижного растворителя употребляют, например, водонасыщенный фенол (или н. бутиловый спирт, амиловый спирт и т.д.). Неподвижным растворителем являются вода, пары которой насыщают фильтровальную бумагу. Чем меньше растворимость аминокислот в воде и чем больше их растворимость в

феноле, тем быстрее они движутся вслед за фронтом органического растворителя.

Положение аминокислот на бумаге можно обнаружить с помощью цветной реакции с нингидрином. Реакцию проводят путем опрыскивания из пульверизатора высушенной полоски бумаги 0,1-0,2 % спиртовым раствором нингидрина с последующим нагреванием ее в сушильном шкафу. Отдельные аминокислоты обнаруживаются в виде пятен, окрашенных в голубой, фиолетовый или оранжевый цвет (в зависимости от химической структуры аминокислоты). Скорость перемещения отдельных аминокислот может быть выражена посредством коэффициента распределения R_f .

Коэффициентом распределения называется отношение расстояния (в мм) от места нанесения аминокислоты до середины ее пятна (a) к расстоянию (в миллиметрах) от места нанесения аминокислоты до фронта растворителя

Коэффициент распределения является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги и т.д.).

Ход работы. Вырезают полоску фильтровальной бумаги длиной 12-15 см, шириной 1,5 см. Через верхний конец полоски протягивают нитку длиной 15-20 см и завязывают ее узелком. На нижнем конце полоски на расстоянии 1 см от края наносят карандашом кружок диаметром 3-4 мм. В середину кружка с помощью капилляра наносят маленькую каплю исследуемого раствором смеси аминокислот (например, смесь глутаминовой кислоты, аланина и лейцина). Место, где была нанесена капля раствора, слегка подсушивают на воздухе

На дно пробирки длиной 18-20 см, диаметром 2-2,5 см осторожно, не смачивая стенок, наливают из пипетки 15-20 капель фенола (или бутанола), насыщенного водой. Приготовленную бумажную полоску, придерживая за нитку, опускают в пробирку с водонасыщенным фенолом (бутанолом) так, чтобы она погрузилась в жидкость на 2-3 мм и висела вертикально (не касаясь стенок). Пробирку закрывают пробкой, ставят в штатив и помещают в термостат при температуре 35-40 °С на 1,5-2 ч. За это время фронт растворителя поднимается на 10-12 см. По истечении указанного времени полоску вынимают из пробирки (за нитку) и подвешивают в вертикальном положении на 10-15 мин в сушильном шкафу, нагретом до 50-100 °С.

Через 10-15 мин после испарения фенола (или бутанола) бумажную полоску вынимают из пробирки и подвешивают на штатив, опрыскивают из пульверизатора 0,1-0,2% раствором нингидрина и вновь помещают в сушильный шкаф при температуре 100-110°С на 5-6 мин. В результате

нагревания в местах, где присутствуют аминокислоты, появляются синие или фиолетовые пятна.

Бумажную полоску кладут на стеклянную пластинку и с помощью линейки измеряют расстояния: 1) от места нанесения капли раствора до середины каждого пятна (а); 2) от места нанесения капли раствора до фронта растворителя (b). Вычисляют коэффициент распределения аминокислот. Таким же образом для контроля вычисляют Rf стандартных известных аминокислот (хроматограммы с известными аминокислотами ставят параллельно). Путем сравнения значений (Rf) известных аминокислот со значениями (Rf) аминокислот смеси определяют состав смеси (табл. 5).

Таблица 5 – Значения (Rf) аминокислот при температуре 20°C

Аминокислота	Растворитель	Аминокислота	Растворитель
Цистин		Тирозин	
Цистеин		Валин	
Аспаргиновая кислота		Метионин	
Глутаминовая кислота		Лейцин	
Серин		Фенилаланин	
Лизин		Изолейцин	
Треонин		Аргинин	
Аланин		Глицин	

1.9. Определение общего азота по методу Кьельдаля

Метод определения азота по Кьельдалю в тканях, биологических жидкостях и водных экстрактах применяется в трех модификациях: макрометод, полумакрометод и микрометод. Эти методы используются в зависимости от количества белка и небелковых азотистых веществ в исследуемом объекте, количества материала и целей анализа.

Сущность метода. Белок или ткань с белком сжигают в присутствии концентрированной серной кислоты и катализаторов, в результате чего содержащийся в нём аминный, амидный, имин-ный и другие виды азота превращаются в аммиак, а последний в сернокислый аммоний. Образовавшуюся аммиачную соль разлагают едкой щелочью и выделившийся аммиак отгоняют в титрованный раствор серной кислоты, взятый в избытке. Оставшуюся серную кислоту оттитровывают щелочью и по количеству серной кислоты, связавшейся аммиаком, рассчитывают процентное содержание азота в исследуемом материале.

Ход работы.

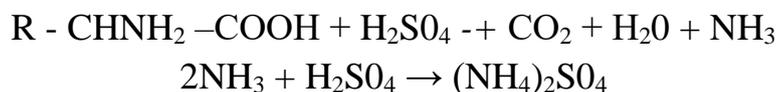
Первый этап. Минерализация. В колбу Кьельдаля на 50 мл вносят 0,2 мл сыворотки или отвешивают 150-250 мг ткани (печень, мышца, почка и др.) И при помощи кусочка стекла навеску опускают на дно колбы Кьельдаля

Добавляют 1-2 мл концентрированной серной кислоты и колбу ставят на огонь (плитка или газовая горелка с песочной баней) в вытяжном шкафу и нагревают.

Когда смесь приобретёт коричневую окраску и исчезнут кусочки ткани, колбу снимают с огня, дают немного остыть и добавляют 5-6 капель пергидроля, встряхивая содержимое колбы, и ставят снова на огонь. Пергидроль добавляют ещё 1-2 раза до получения бесцветного минерализата.

Если в качестве катализатора используется селен, то небольшое количество его добавляют после внесения 1-2 мл серной кислоты, т. е. в начале сжигания.

Химизм первого этапа:



Второй этап. Отгонка аммиака. Вторая часть работы выполняется в перегонном аппарате, схема которого дана на рис. 2.

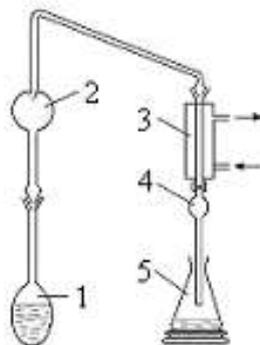


Рис. 2. Схема перегонного аппарата Кьельдаля

1 – перегонная колба; 2 - насадка с каплеуловителем, 3 - холодильник, 4 – удлинительная приставка, 5 – приемная колба

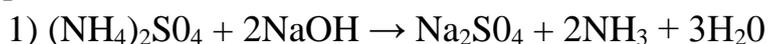
Жидкость из колбы для сжигания разбавляют водой и переносят количественно в перегонную колбу путем 3-4-кратного смывания дистиллированной водой. Затем доводят общий объём до половины колбы, затем вносят несколько кусочков пемзы или стеклянных трубочек для равномерного кипения.

Вносят 2-4 капли индикатора метилрот (реакция кислая), отверстие колбы закрывают пробкой, в которую вставлены воронка и каплеуловитель, соединенный с холодильником. Одновременно с этим в приёмник отмеривают 20 мл (точно!) 0,1 н. раствора серной кислоты и прибавляют 2-4

капли индикатора метилового красного. В этот титрованный раствор кислоты опускают конец форштосса, который другим своим концом присоединён к холодильнику. Через воронку в перегонную колбу добавляют 33-40%-ный раствор едкого натрия (каплями) до тех пор, пока жидкость не приобретёт жёлтой окраски (реакция щелочная).

Включают холодильник и, нагревая колбу, начинают отгонку аммиака. Жидкость в перегонной колбе кипятят до полной отгонки аммиака, что узнают по отсутствию изменения цвета красной лакмусной бумажки при нанесении на неё капли жидкости, вытекающей из холодильника.

Химизм второго этапа:



Третий этап. Титрование и расчёт. Прекращают нагревание отгонной колбы и разъединяют приёмник с холодильником.

В бюретку наливают 0,1 н. раствор едкого натрия и оттитровывают остаток серной кислоты в колбе-приёмнике, не связавшейся с аммиаком.

Расчёт азота ведут по следующей формуле:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 1,4 \cdot 100}{c}, \text{ где}$$

x – количество азота, в мг% в исследуемом объекте, a – количество 0,1 н. раствора серной кислоты, находившейся в приёмнике, b – количество 0,1 н. раствора едкого натрия, пошедшее на нейтрализацию серной кислоты, не связавшейся с аммиаком, 1,4 – мг азота, которому соответствует 1 мл 0,1 н. раствора серной кислоты, c – навеска ткани, в мг, 100 – для пересчётов, в мг%.

1.10. Определение белкового и небелкового азота по методу Кьельдаля

Небелковые соединения хорошо растворяются в воде и, в отличие от белков, не осаждаются белковыми осадителями. При обработке испытуемого материала белковым осадителем белок переходит в осадок, а небелковые азотсодержащие соединения остаются в надосадочной жидкости. В качестве осадителей белков используются растворы сульфата аммония, также 10 или 20%-ные растворы ТХУ. С помощью фильтра отделяют осадок от раствора и определяют азот белковый (в осадке) и азот небелковый (в фильтрате).

1.11. Определение белка по методу Лоури

Определение белка по методу Лоури основано на комбинации биуретового метода (образование окрашенного комплекса пептидных связей с медью) и метода Фолина (образование окрашенного комплекса реактива Фолина с ароматическими аминокислотами). Метод Лоури имеет ряд преимуществ, в сравнении с двумя вышеназванными методами. Комбинированный метод Лоури в 100 раз чувствительнее биуретовой реакции, и точность определений мало зависит от состава белка. Метод прост и удобен для серийных анализов.

Ход работы. 0,4 см³ испытуемого раствора белка (50... 5 00 мг) и 2 см³ реактива С перемешивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляют 0,2 см³ реактива D, очень быстро перемешивают (в течение 1-2 секунд) и оставляют на 30-40 минут при комнатной температуре для развития окраски. По истечении указанного времени интенсивность окраски образовавшегося комплекса измеряют на ФЭЖе при красном светофильтре или на спектрофотометре при 760 нм. Содержание белка определяют по калибровочной кривой.

Определению белка по методу Лоури мешают: мочевая кислота, гуанин и гликокол, ксантин, серноокислый аммоний при массовой доле в среде более 5 %.

Определению белка по методу Лоури не мешают: Na₂SO₄ (меньше 1 %), трихлоруксусная кислота (меньше 0,5 %), этанол (меньше 5 %), серный эфир (меньше 5 %), ацетон (меньше 0,5 %).

1.12. Определение белка спектрофотометрическим методом (метод Варбурга и Кристиана)

Методика. В кювете с толщиной слоя 1 см измеряют поглощение A (экстинкцию, оптическую плотность) разбавленного соответствующим образом раствора белка при 260 и 280 нм.

Вычисление концентрации белка.

1) Вычисляют отношение A_{280}/A_{260} . С помощью таблицы (или с помощью графика, построенного по приведенным в таблице данным) находят множитель f , соответствующий данному отношению

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = A_{260} \cdot f.$$

Для вычисления концентрации белка можно также использовать формулу:

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = 1,55A_{280} - 0,76A_{260}$$

Значения A_{280} для большинства белков при концентрации 1 мг/мл находятся в диапазоне 0,5 ÷ 2,0 (известно также довольно много белков, для которых A_{280} не попадает в указанный диапазон).

Таблица 6 - Показатели для спектрофотометрического определения концентрации белка

A_{280}/A_{260}	Содержание НК, %	Множитель f	A_{280}/A_{260}	Содержание НК, %	Множитель f
1,75	0	1,118	0,86	5,2	0,671
1,60	0,30	1,078	0,84	5,6	0,650
1,50	0,56	1,047	0,82	6,1	0,628
1,40	0,87	1,011	0,80	6,6	0,605
1,30	1,26	0,969	0,78	7,1	0,581
1,25	1,49	0,946	0,76	7,8	0,555
1,20	1,75	0,921	0,74	8,5	0,528
1,15	2,05	0,893	0,72	9,3	0,500
1,10	2,4	0,863	0,70	10,3	0,470
1,05	2,8	0,831	0,68	11,4	0,438
1,00	3,3	0,794	0,66	12,8	0,404
0,96	3,7	0,763	0,64	14,5	0,368
0,92	4,3	0,728	0,62	16,6	0,330
0,90	4,6	0,710	0,60	19,2	0,289
0,88	4,9	0,691			

2. Ферменты

2.1. Свойства ферментов

Ферментами называются соединения белковой природы, выполняющие роль катализаторов всех биохимических процессов, протекающих в организме.

Ферменты относятся к простым и сложным белкам. В простетическую группу некоторых ферментов входят витамины. Так, например, в состав простетической группы флавиновых ферментов входит рибофлавин, в состав некоторых декарбоксилаз входит тиамин и т.д.

Физико-химические свойства ферментов обусловлены их белковой природой. Ферменты не диализируют сквозь полупроницаемые мембраны, способны высаливаться и дают характерные для белка цветные реакции и

реакции осаждения. При выделении ферментов методами высаливания, фракционирования ацетоном и колоночной хроматографии они не теряют каталитических свойств, что позволяет выделять активные ферментные препараты для практических целей (пепсин, трипсин, амилаза, липаза и др.).

Ферменты, которые удалось выделить в кристаллическом состоянии, обладают очень высокой удельной активностью. Растворы кристаллических ферментов способны проявлять каталитические свойства при таких незначительных концентрациях фермента, при которых белковая природа фермента не может быть обнаружена обычными химическими реакциями на белок.

Ферменты, ускоряющие реакции в организме, имеют ряд существенных отличий от неорганических катализаторов, обусловленных их белковой природой. Ферменты термолабильны, действие их строго специфично, активность сильно изменяется в зависимости от рН среды, присутствия электролитов и других веществ, активирующих или парализующих действие ферментов.

Ферменты разделяются на классы согласно типу катализируемой реакции. Название ферментов составляется из двух частей. Первая часть указывает название субстрата, вторая часть названия с окончанием «аза» указывает природу реакции.

Все ферменты разделяются на 6 основных классов.

1. Оксидоредуктазы катализируют окислительно-восстановительные реакции, например глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа.

2. Трансферазы катализируют реакции переноса целых группировок (СООН и др.), например, аспаратаминотрансфераза, фосфороглицератмутаза и др.

3. Гидролазы катализируют реакции расщепления сложного вещества на простые с присоединением частицы воды, например, липаза, α -амилаза, В-фруктофуранозидаза и др.

4. Лиазы катализируют реакции отщепления от субстрата негидролитическим путем определенных групп: NH_3 , CO_2 , H_2O , H_2S и др. с образованием двойной связи, а также обратное присоединение частицы воды и др. по месту двойной связи, например, аспаратаммиаклиаза, фосфопируватгидратаза и др.

5. Изомеразы катализируют реакции изомеризации, например, превращение альдегидов в кетоны, цисформы в трансформу, и наоборот.

6. Синтетазы или лигазы катализируют присоединение друг к другу двух молекул, сопряженное с разрывом пиррофосфорной связи в молекуле АТФ, например, ацетил-КоА-синтетаза.

Влияние температуры на активность ферментов

Ферментный катализ обуславливается также и влиянием температуры. Во многих случаях при определении активности. Так, высокие температуры (более 40°C) ведут к инактивации некоторых ферментов, что иногда используют для удаления их в препаративной работе. Наиболее целесообразными температурами для физиологических характеристик активности ферментов следует считать близкие к температурам тела соответствующих животных, хотя комитет по ферментам Международного биохимического союза рекомендует там, где это возможно, придерживаться температуры 30°C.

Влияние рН среды на активность ферментов

Так как у ферментов основа белковая, то на их свойства существенно влияет рН среды. Большинство ферментов проявляет свою активность только в определенном диапазоне рН, который называют оптимум рН. Для многих ферментов оптимум рН находится в среде, близкой к нейтральной или слабокислой. Однако пищеварительные ферменты пепсин и трипсин активны в крайне противоположных диапазонах рН: первый при 1,5-2,5, а второй –

В ряде случаев рН служит регулирующим фактором в переключении направления путей превращения отдельных веществ. В связи с этим регулирование постоянства рН среды – существенный момент в регуляции активности ферментов.

Влияние кофакторов, активаторов и ингибиторов на активность ферментов

На основании многочисленных наблюдений и экспериментов выявлено, что важным условием для обеспечения активности ферментов в организме животных является обеспеченность их кофакторами, необходимыми для проявления того или иного фермента. Это относится к витаминам, являющимся коферментами многих ферментов. На основании этого было разработано применение витаминов в лечебной практике с целью регулирования действия соответствующих ферментов.

Отклонения в активности ферментов наблюдаются также в случаях недостатка какого-либо металла или иона, необходимых проявления их активности. Так, отдельные пептидазы для своей активности нуждаются в присутствии Mn^{2+} , Zn^{2+} или Co^{2+} , АТФ-аза Mn^{2+} , а амилаза – иона хлора. Ряд ферментов содержит в своем составе металлы, поэтому их называют металлопротеидами.

Торможение активности ферментов называют *ингибированием*. Вещества, вызывающие торможение реакции называют *ингибиторами*. Ингибирование активности ферментов различно по происхождению. Одним из факторов может быть ингибирование избытков субстрата, которое снимается при уменьшении его концентрации. Необратимое ингибирование, например, при связывании – SH групп ферментов моноиодацетатом или N-этилмалеилимидом – одним из способов, применяемых при изучении механизмов ферментных реакций. Физиологически важно аллостерическое ингибирование, которое связано с механизмами обратных связей. В этом случае конечный продукт цепных биохимических реакций влияет как аллостерический ингибитор. При накоплении конечного продукта реакция постепенно тормозится до полной ее остановки, а при расходовании продукта реакция восстанавливается, так как аллостерическое ингибирование обратимо.

Обратимые ингибирования бывают конкурентные и неконкурентные. Пример конкурентного – ингибирование сукцинатдегидрогеназы малонатом. Конкурентное ингибирование связано со сходством ингибитора с субстратом. Оно может быть уменьшено или устранено увеличением концентрации субстрата. В этом случае ингибитор и субстрат конкурируют за один и тот же центр связывания в молекуле фермента.

2.1.1. Изучение термолабильности ферментов

Термолабильность ферментов объясняется тем, что температура, с одной стороны, воздействует на белковую часть фермента, приводит при высокой температуре к денатурации белка и понижению каталитической функции, а с другой стороны, оказывает влияние на скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса и на все следующие этапы преобразования субстрата, что ведет к усилению или замедлению катализа.

Ферменты проявляют наибольшую активность при определенной температуре, которая называется оптимальной. Некоторое повышение или понижение температуры относительно оптимальной ведет к снижению активности фермента. Потеря ферментативной активности при кипячении обусловлена денатурацией белка, связанной с разрушением его вторичной и третичной структуры. Сухие препараты ферментов выдерживают нагревание до 100°C без заметной потери активности. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются, так как они либо замедляются, либо останавливают ферментативное действие.

Многие ферменты сравнительно легко могут быть извлечены из клеток водой, слабыми растворами нейтральных солей, кислот и щелочей, водными

растворами спирта, ацетона, глицерина и др. При этом в раствор, кроме фермента, переходят различные белковые и другие сопутствующие вещества, которые затрудняют получение ферментов в чистом виде и требуют длительной дальнейшей обработки. Некоторые ферменты, как, например, β -фрукто-фуранозидаза (сахараза), прочно связаны с элементами клеточной структуры и могут быть извлечены в раствор только после автолитического расщепления или механического разрушения клеток. В этом случае необходимо прибегать к высушиванию материала, растиранию с песком или стеклом, замораживанию жидким воздухом и к другим способам.

Скорость ферментативной реакции закономерно увеличивается примерно вдвое с повышением температуры на каждые 10 °С. С 45-50 °С начинается денатурация фермента от нагревания. Постепенное разрушение фермента приводит к тому, что скорость основного химического процесса, катализируемого ферментом, замедляется и, наконец, прекращается. Наивысшая температура, при которой сохраняются нативные свойства ферментов и действие ферментов, может продолжаться длительный период, называется оптимальной температурой. Для большинства ферментов оптимальная температура находится в пределах 35-45 °С.

Ход работы. В три пробирки наливают по 2-3 мл разбавленной слюны (амилаза). Слюну в пробирке 1 кипятят в течение 1-2 минут. Затем во все пробирки добавляют по 4-5 мл крахмала. Пробирки 1 и 2 ставят в термостат С) на 10 мин. Пробирку 3 погружают на 10 мин в лед. По истечении указанного времени во все пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя. Результаты опыта заносят в таблицу термолабильности ферментов и делают выводы.

2.1.2. Влияние рН среды на активность ферментов

Ферменты очень чувствительны к изменению реакции среды, в которой они действуют. Для каждого фермента имеется определенная концентрация водородных ионов, при которой он наиболее активен (оптимум рН). Изменение активной кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума рН вызывает понижение активности фермента. Влияние рН на активность ферментов можно наблюдать на примере действия α -амилазы слюны на крахмал. Активность α -амилазы слюны самая высокая при рН, близком к нейтральному значению (6,8-7,2). Активность фермента снижается при добавлении как кислот, так и щелочей.

Ход работы. В три пробирки наливают по 3 мл крахмала. В первую приливают 1 мл дистиллированной воды, во вторую — 1 мл соды, в третью — 1 мл раствора соляной кислоты. Затем во все пробирки прибавляют по 1

мл разбавленной слюны, содержимое перемешивают и ставят в термостат на 20-25 мин при 37 °C. По истечении указанного времени пробирки вынимают, охлаждают и добавляют в каждую 1-2 капли раствора йода. В первой пробирке происходит расщепление крахмала (красно- бурое или желтое окрашивание). Во второй и третьей пробирках реакция протекает слишком медленно вследствие высокой щелочности и кислотности, по сравнению с оптимальной реакцией среды для действия амилазы, поэтому здесь получается синее окрашивание с раствором йода, характерное для амилодекстрина.

2.1.3. Определение активности ферментов

Значительное влияние на активность ферментов оказывают активаторы и ингибиторы - ионы металлов и органические вещества. В роли активаторов ферментов часто выступают различные микроэлементы и водорастворимые витамины.

Среди веществ, вызывающих ингибирование активности какого- либо фермента, большое значение имеют специфические ингибиторы, которые по характеру своего действия подразделяются на обратимые и необратимые. В свою очередь, ингибиторы, вызывающие обратимое торможение, разделяют на конкурентные и неконкурентные. Например, малонат является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы, ионы тяжелых металлов и др.) – неконкурентными ингибиторами.

Ход работы. В три пронумерованные пробирки приливают по 1 мл раствора амилазы слюны. Первую пробирку оставляют для контроля, во вторую пробирку добавляют 2 капли 1% раствора хлорида натрия, в третью 2-3 капли 1% раствора сульфата меди. Затем в каждую пробирку добавляют 0,5 мл 0,5% раствора крахмала, перемешивают и ставят пробирки в штатив при комнатной температуре. Через каждые 2-3 мин из всех пробирок берут пробы по 1-2 капли на предметные стекла, добавляют по 1 капле раствора йода и устанавливают степень гидролиза крахмала.

Для каждого фермента существует оптимальное значение pH среды, при котором создаются наиболее благоприятные условия для поддержания функционально активной конформации молекулы. Однако, в живых организмах оптимум pH фермента не обязательно совпадает со значением pH, характерным для нормального внутриклеточного окружения этого фермента.

Оборудование, реактивы: пипетки, термостат, фосфатные растворы с pH 4; 7,2; 9; раствор амилазы; реактив Люголя, крахмал, 1%-й раствор.

Ход работы. В три пробирки приливают по 2-3 мл буферных растворов с различным pH. Во все пробирки добавляют по 2-3 мл раствора амилазы

(раствор слюны) и 4-5 мл раствора крахмала, перемешивают и инкубируют 10 мин в термостате (37°C). Затем в каждую пробирку добавляют по 1 капле реактива Люголя. Результаты наблюдения оформляют в виде таблицы, показывающей влияние рН на активность амилазы слюны.

3. Углеводы

Углеводы – группа природных полигидроксиальдегидов и полигидроксикетонов с общей формулой $(CH_2O)_n$. Группа включает в себя простые сахара (моносахариды) и их высокомолекулярные аналоги: олигосахариды и полисахариды.

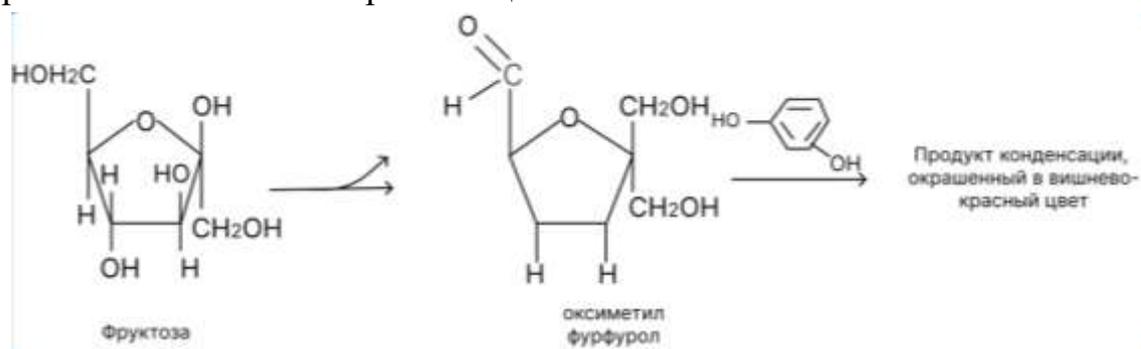
Углеводы находятся в растительных, животных и бактериальных организмах. Главная функция углеводов – источник энергии. Энергия, образующаяся при распаде углеводов, частично используется для поддержания температуры тела, а главным образом накапливается в виде макроэргических фосфорных соединений – аденозинтрифосфата (АТФ). Эта энергия используется для выполнения различных биохимических функций. Углеводы, кроме того, выполняют структурные функции: входят в состав нуклеотидов, нуклеиновых кислот, клеточных мембран, гликопротеинов, гликолипидов.

3.1. Качественные реакции на моносахариды

Моносахариды – вещества, не способные подвергаться гидролизу. По химическому строению моносахариды представляют собой альдегидо- или кетомношатовые спирты. По числу атомов углерода моносахариды подразделяют на триозы, гептозы, пентозы, гексозы и т.д., из которых наиболее распространенными в природе являются два последних вида.

Реакция Селиванова на кетогексозы

При нагревании фруктозы (и других кетогексоз) с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол, который с резорцином образует соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет:



Альдозы также дают эту реакцию, но реакция у них протекает медленнее и в особых условиях (температура и кислотность среды).

Ход работы. В две пробирки наливают по 3 мл реактива Селиванова, в одну из них прибавляют 3 капли раствора фруктозы, в другую – 3 капли раствора глюкозы. Обе пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 80

°С, и держат в ней 8 мин. За это время в пробирке с фруктозой появляется красное окрашивание.

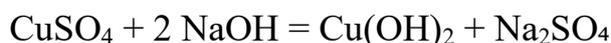
Реакция на восстанавливающие свойства моносахаридов

Все моносахариды, имеющие свободную карбонильную группу (альдегидную или кетонную), обладают способностью в щелочной среде при нагревании восстанавливать окисные формы металлов в закисные. Моносахариды при этом образуют соответствующие кислоты.

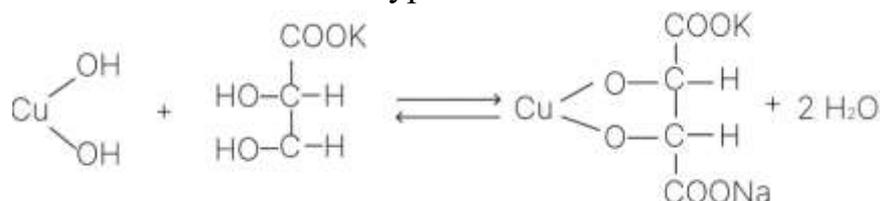
Реакция Феллинга восстановление гидрата окиси меди, заключается в восстановлении моносахаридами гидрата окиси меди в закись меди.

При проведении реакции используется реактив Фелинга, представляющий собой смесь медного купороса с сегнетовой солью (К. На виннокислый) в щелочной среде.

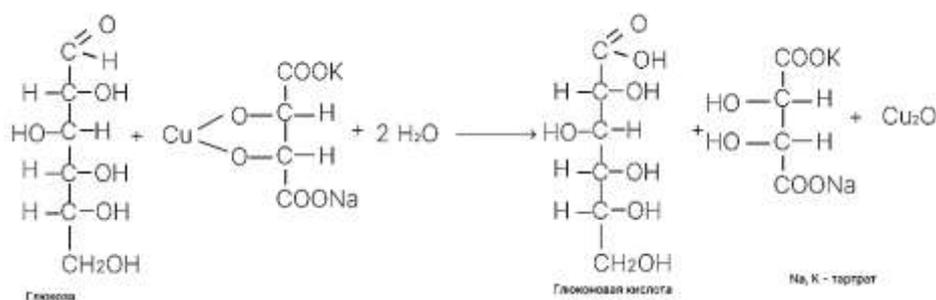
При смешивании этих растворов образуется осадок гидрата окиси меди по уравнению



Выпавший гидрат окиси меди далее реагирует с сегнетовой солью, образуя алколюлят сегнетовой соли по уравнению



В присутствии сегнетовой соли в щелочной среде гидрат окиси меди не выпадает в осадок, так как образуется растворимое комплексное соединение окисной меди с сегнетовой солью. При взаимодействии с сахарами реактив Фелинга окисляет альдегидные группы сахаров, переводя их в карбоксильные за счет кислорода окиси меди, которая переходит в закись меди Cu_2O и выпадает в виде красного осадка. Схематично реакцию окисления сахаров раствором Фелинга можно представить по уравнению.



Ход работы. К 1-2 мл 1% раствора глюкозы приливают такой же объем реактива Фелинга и нагревают на кипящей водяной бане. Реактив сначала желтеет, затем приобретает красно-коричневый цвет, образуя закись меди и глюконовую кислоту.

3.2. Олигосахариды и полисахариды

Олигосахариды (от греческого «олигос» немногий) - вещества, образованные из нескольких остатков молекул моносахаридов (от 2-х до 10). В зависимости от числа остатков моносахаридов, входящих в молекулы олигосахаридов, последние делят на дисахариды, трисахариды и т.д. Широко распространенной группой являются дисахариды.

Полисахариды - вещества, образованные из большого числа остатков молекул моносахаридов. Полисахариды имеют один или два свободных концевых гликозидных гидроксила на большое число связанных молекул моносахарида, поэтому они практически не проявляют восстанавливающих свойств.

Крахмал и сахароза – обычные углеводы пищи. Амилаза и сахараза – ферменты, участвующие в расщеплении этих углеводов. Амилаза слюны расщепляет крахмал до мальтозы и, затем, мальтаза расщепляет последнюю до свободной глюкозы. Сахароза кишечного сока расщепляет сахарозу до глюкозы и фруктозы. Источником ферментов могут быть слюна (для амилазы) и пекарские дрожжи (для сахаразы).

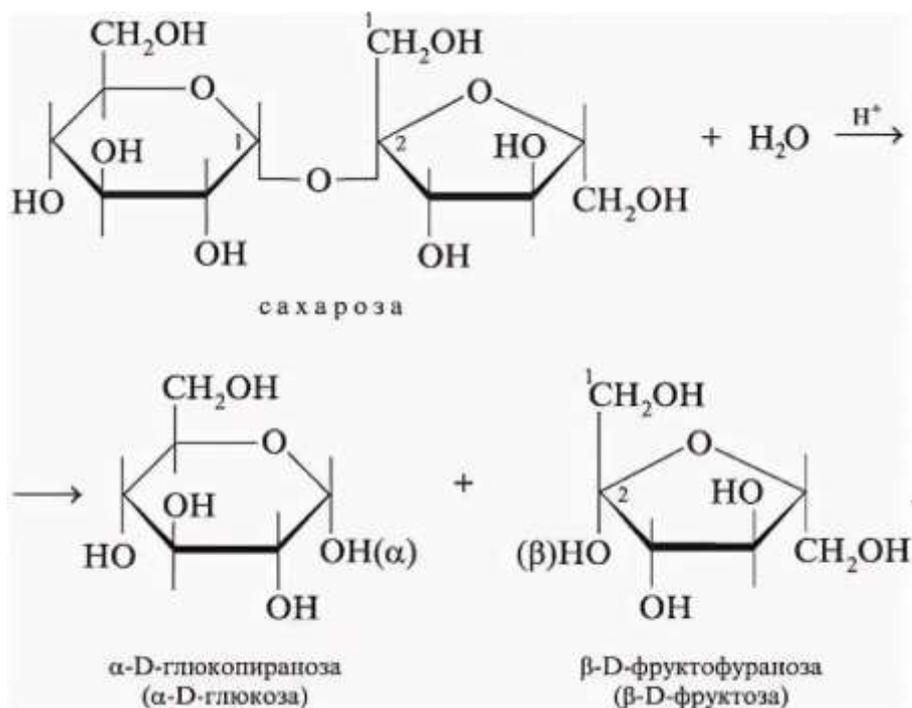
Изучение восстанавливающих свойств сахарозы и мальтозы

Дисахариды построены по типу гликозидов, т.е. при образовании дисахарида одна молекула моносахарида образует связь с другой за счет своего гликозидного гидроксила. Вторая молекула моносахарида участвует в образовании связи двумя путями: 1) спиртовым гидроксилом; 2) гликозидным гидроксилом. В первом случае в молекуле дисахарида остается свободным гликозидный гидроксил, благодаря чему дисахариды обладают восстанавливающими свойствами (мальтоза, лактоза, целлобиоза). Во втором случае в молекуле дисахарида нет свободного гликозидного гидроксила, вследствие чего он лишен восстанавливающих свойств (сахароза, трегалоза).

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл 1% раствора дисахарида: в первую сахарозы, во вторую мальтозы. Проводят реакцию Фелинга. В пробирке с сахарозой восстановление гидрата окиси меди в закись не наблюдается, в пробирке с мальтозой, обладающей восстанавливающими свойствами, образуется закись меди.

Кислотный гидролиз сахарозы

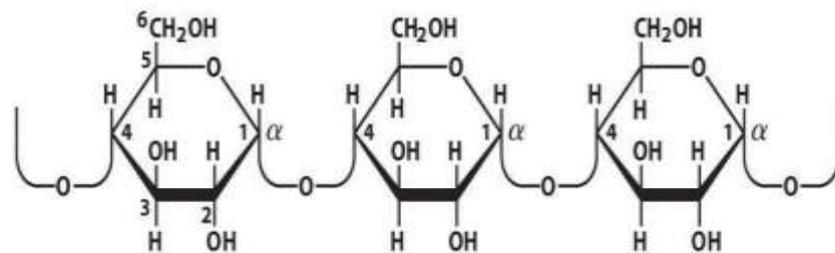
При нагревании с кислотами происходит гидролиз дисахаридов - распад их на две молекулы моносахаридов. Сахароза при гидролизе распадается на *α*-D-глюкопиранозу и *β*-D-фруктофуранозу:



Ход работы. В пробирку наливают 2 мл 1% раствора сахарозы, 1 мл 10% раствора серной кислоты и кип его небольшими порциями до тех пор, пока не прекратится выделение углекислого газа. Проводят реакцию Фелинга. Положительная реакция указывает на образование моносахаридов, так как сама сахароза не восстанавливает гидрат окиси меди.

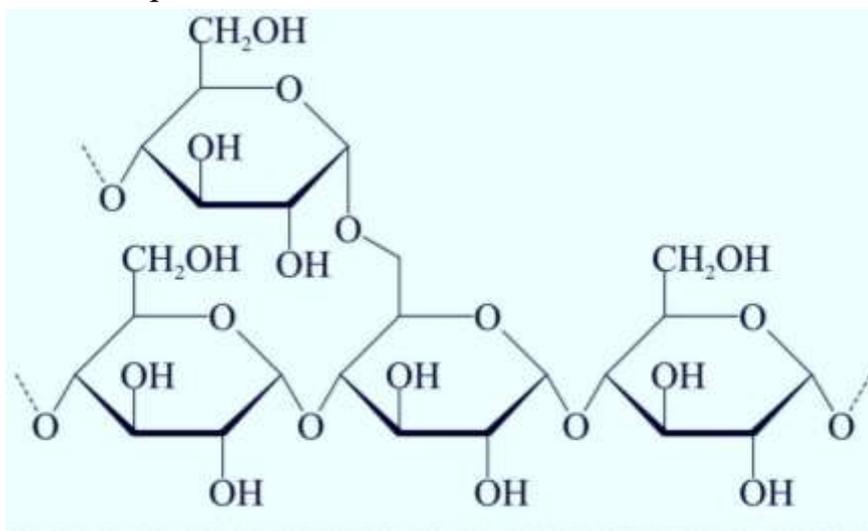
Кислотный гидролиз крахмала

Крахмал, широко распространенный резервный полисахарид растений, является наиболее важным углеводным компонентом пищевого рациона. В растениях крахмал содержится в хлоропластах листьев, плодах, семенах и клубнях. Особенно высоко содержание крахмала в зерновых культурах (до 75% от сухой массы), клубнях картофеля (примерно 65%). Крахмал - химически неоднородное вещество. Его образуют молекулы двух типов - амилоза и амилопектин. Амилоза представляет собой неразветвленный полимер, который состоит из 1000- 4000 остатков α-D-глюкопиранозы, соединенных 1,4-гликозидными связями:



Амилоза

Амилопектин - разветвленный полимер, который также состоит из остатков α -D-глюкопиранозы. В пределах каждой короткой цепи гликозидные остатки соединены 1,4-гликозидными связями. Цепи друг с другом соединены посредством 1,6-гликозидных связей.



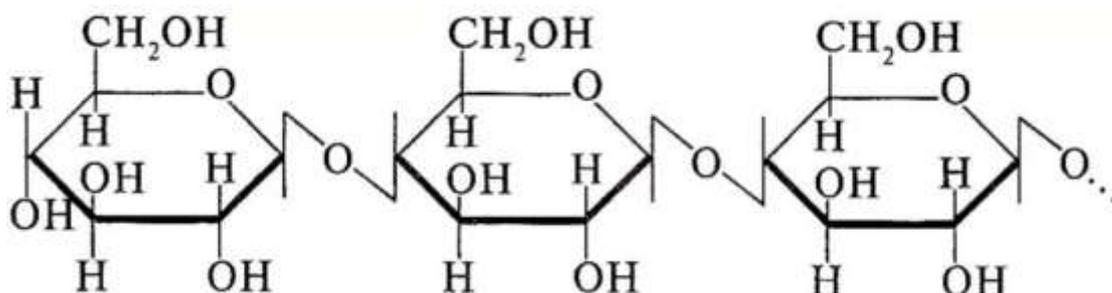
В воде крахмал растворяется с трудом. Йодом окрашивается в синий цвет в результате образования комплексных и адсорбционных соединений. Под действием кислоты крахмал расщепляется в конечном счете до глюкозы. При гидролизе крахмала в качестве промежуточных соединений образуются декстрины, которые в зависимости от величины своей молекулы при добавлении раствора йода окрашиваются сначала в синий, затем в фиолетовый, красный, оранжевый и желтый цвета.

Ход работы. Для гидролиза в пробирку наливают 10 мл 1% раствора крахмального клейстера, прибавляют 2-3 мл 40% раствора H_2SO_4 и ставят на водяную баню при температуре 80-90 °C. Через каждые две мин. отбирают 0,5-1 мл гидролизата в чистые сухие пробирки, прибавляют малыми порциями сухой бикарбонат натрия для нейтрализации серной кислоты (до прекращения выделения пузырьков газа). В нейтрализованный раствор прибавляют несколько капель раствора йода. Пробу гидролизата берут до тех

пор, пока желтая окраска йода не перестанет изменяться. Пробирки в порядке отбора проб хранят в штативе. По окончании гидролиза проводят реакцию Фелинга с гидролизованным и негидролизованным крахмалом. Для сравнения также проводят окрашивание йодом негидролизованного крахмала.

Растворение целлюлозы

Целлюлоза представляет собой неразветвленный полимер, который состоит из остатков *B*-Д-глюкопиранозы, соединенных 1,4- гликозидными связями:



Эти связи не гидролизуются пищеварительными ферментами большинства млекопитающих. Нитевидные молекулы целлюлозы соединяются в пучки-мицеллы (в каждой мицелле по 40-50 молекул). Соединение отдельных молекул целлюлозы в мицеллы происходит благодаря водородным связям, которые образуются за счет адсорбированных целлюлозой молекул воды. Целлюлоза является основным материалом стенок растительных клеток.

В воде, спирте и других обычных растворителях целлюлоза нерастворима, она растворяется в концентрированных растворах некоторых солей ($ZnCl_2$, $SnCl_2$ и др.), а также в некоторых щелочных растворах, например аммиачном растворе гидрата окиси меди (реактив Швейцера).

Ход работы. В пробирку наливают 1-2 мл реактива Швейцера, погружают в него небольшой кусочек ваты и помешивают содержимое стеклянной палочкой до растворения. Получается прозрачная густая вязкая жидкость. В стеклянный стакан наливают 50 мл воды, добавляют 2-3 мл концентрированной серной кислоты, выливают тонкой струей раствор целлюлозы, которая выделяется из раствора в виде нитей.

Кислотный гидролиз целлюлозы

При кислотном гидролизе целлюлозы конечным продуктом является *B*-Д-глюкоза.

Ход работы. В пробирку помещают кусочек ваты, заливают его 72% раствором серной кислоты в соотношении 1:3. После полного растворения (15-20 мин) раствор осторожно разводят водой в 10-15 раз и выдерживают в

кипящей водяной бане 30 мин, после этого раствор охлаждают, отбирают 2-3 мл гидролизата, нейтрализуют 40% раствором NaOH и проводят реакцию Фелинга. Положительная реакция свидетельствует о том, что при гидролизе целлюлозы образуется *B-D*- глюкоза.

4. Биоконверсия растительного сырья

4.1. Общая характеристика и классификация растительного сырья

Растительное сырье – это свежие или высушенные части растений (корни, стебли, листья, цветки, плоды, семена), которые заготавливаются для дальнейшей переработки и использования в различных отраслях, таких как производство пищевых продуктов, лекарств, косметики или как материал для промышленности.

Пищевое растительное сырье подразделяется на культивируемое и дикорастущее. К культивируемому сырью относится плодоовощное традиционное, плодоовощное генетически модифицированное, зерно и продукты его переработки (традиционное и генетически модифицированное), травянистое; к дикорастущему – плодоовощное традиционное и травянистое.

Для производства продуктов питания используется растительное сырье одного вида, разных видов, а также в комплексе с животным сырьем.

Растения являются источником усвояемых углеводов (глюкозы, фруктозы, крахмала), неусвояемых углеводов (клетчатки), витаминов, органических веществ. Они синтезируют органически активные соединения (эфирные масла, гликозиды и др.). К группе, содержащей моно- и дисахариды, относятся однолетние и многолетние растения. Из однолетних – это сахарная свекла, сахарный тростник, сорго и др.

К многолетним в основном относятся плодово-ягодные растения, плоды которых накапливают более 5 % сахаров от общего веса. Сахаросодержащие растения представляют большой интерес для биотехнологических процессов. Но так как плоды этих растений непосредственно используются в пищу, то для биотехнологических целей могут быть использованы только отходы после их переработки. В мировом масштабе количество субстратов этой категории, вероятно, составило бы десятки миллионов тонн. Однако их сбор и переработка обошлись бы дорого, поэтому эти субстраты просто не учитываются.

Плодоовощное сырье, используемое для переработки, подразделяют на следующие группы: семечковые (яблоки, груша, айва), косточковые (черешня, вишня, слива, абрикосы, персики, кизил), ягоды (виноград, земляника, крыжовник, смородина и др.), орехи, тропические и субтропические плоды (апельсины, лимоны, мандарины и др.).

Различают плодовую группу овощей, у которых в пищу используются плоды и семена, и вегетативную группу, съедобной частью которых служат

корни, клубни, стебель или листья. Каждая группа подразделяется на подгруппы.

К плодовой группе относятся: томатные – томаты, баклажаны, овощной перец; бобовые – горох, фасоль, бобы; тыквенные – огурцы, кабачки, патиссоны, тыква, а также бахчевые – арбузы и дыни; зерновые – кукуруза.

К вегетативной группе относятся: клубнеплоды – картофель, земляная груша, батат; корнеплоды – морковь, свекла, петрушка, пастернак, сельдерей, хрен; капустные – капуста белокочанная, цветная, брюссельская; шпинатные – шпинат, щавель; салатные – различные виды салатов, салатный сельдерей; луковичные – лук, чеснок; пряные листовые – укроп, базилик, майоран, чабер, эстрагон; десертные – спаржа.

Зерновые культуры в зависимости от химического состава подразделяются на 3 группы:

- 1) богатые крахмалом – пшеница, рожь, ячмень, овес, кукуруза, рис, просо и семейство гречишных;
- 2) богатые белком (семейство бобовых);
- 3) богатые жиром (масличные культуры).

Солод – это пророщенное и высушенное в специально созданных условиях зерно. Солод используют при производстве пива, полисолодовых экстрактов, получаемых из смеси кукурузного, овсяного и пшеничного солодов, концентрата квасного сусла, хлебного кваса, безалкогольных напитков и этилового спирта.

Основные масличные культуры: плоды и семена масличных растений. Основные масличные культуры: подсолнечник, хлопчатник, соя, рапс. Лен, клещевину, горчицу и другие масличные культуры перерабатывают в сравнительно небольших объемах. Перспективными источниками получения растительных масел являются маслосодержащие отходы пищевых производств (фруктовые косточки), а также отруби и зародыши, получаемые при производстве муки и крупы.

Из зерновых, бобовых и картофеля получают крахмал, из сахарной свеклы и сахарного тростника – сахарозу, из фруктов, ягод и сахарной свеклы – пектин, из масличных культур – растительное масло, из сои и пшеницы – белковые продукты растительного происхождения.

Растительный материал содержит сотни компонентов, которые являются полезными ресурсами для биопроизводства. Растения состоят в основном из углеводов (целлюлозы, других полисахаридов, таких как крахмал, и сахаров), лигнинов, белков и жиров (масел). Крахмал и полимеры сахаров являются конечными продуктами фотосинтеза и составляют

основную часть углеводных запасов растений. Доступ к этим обширным запасам углеводов будет иметь ключевое значение для производства кормов и кормовых добавок.

4.2. Состав растительных клеток

Углеводы. В растительных клетках углеводы присутствуют в высокой концентрации, выполняя структурную (целлюлоза в клеточных стенках), запасующую (крахмал, инулин), энергетическую и пластическую (рибоза, дезоксирибоза в ДНК/РНК) функции. Основные типы — простые сахара (сахароза, глюкоза, фруктоза), сложные полисахариды (целлюлоза, крахмал) и пищевые волокна.

Сахара. Широкий спектр сбраживаемых сахаров можно найти в сельскохозяйственных культурах и отходах сельского хозяйства. Основными источниками сырья являются кукуруза, пшеница, сорго, картофель, сахарная свекла и сахарный тростник; другие источники включают отходы переработки картофеля, мелассу сахарной свеклы и тростника, а также яблочный жмых.

Моносахариды (простые сахара) имеют в своей структуре от трех до шести и более атомов углерода и классифицируются как триозы, тетрозы, пентозы и гексозы соответственно. Среди фруктов и овощей преобладают пентозы и гексозы. Пентозы преимущественно присутствуют в составе гемицеллюлоз, образуя вещества под названием пентозаны, основу которых составляют пятиатомные моносахара — арабиноза и ксилоза. Что касается шестичленных сахаров, то они входят в состав комплексных полисахаридов, включая гемицеллюлозу, целлюлозу, крахмал и гликоген, и часто обнаруживаются в свободной форме.

Среди дисахаридов плоды и овощи содержат больше всего сахарозы. Молекула сахарозы формируется путем соединения молекул глюкозы и фруктозы. Во время обработки продуктов (варка компотов, приготовление варенья) либо длительного хранения сахароза расщепляется посредством гидролиза. Итогом становится образование инвертированного сахара — смеси равных частей глюкозы и фруктозы. Основные углеводы плодов и овощей представлены простыми сахарами: фруктозой (плодовым сахаром), глюкозой (виноградным сахаром) и дисахаридом — сахарозой (свекловичным сахаром).

Сахара могут быть получены напрямую или получены из полисахаридов (таких как целлюлоза и крахмал), а затем, с помощью ферментации, использованы для производства широкого спектра товарных и специальных химикатов. Существующие коммерческие ферментационные

установки в основном используют глюкозу (6-углеродный сахар) для производства этанола, уксусной кислоты, аминокислот, антибиотиков и других химических веществ. В долгосрочной перспективе для удовлетворения потребностей биотехнологической промышленности потребуются новые источники глюкозы.

Значительное увеличение запасов глюкозы доступно из лигноцеллюлозных веществ, содержащихся в большинстве растений, остатках сельскохозяйственных культур и макулатуре. Целлюлоза может быть гидролизована кислотой до глюкозы, хотя большая часть глюкозы разрушается в ходе этого процесса. Вторым по распространенности сахаром, содержащимся в древесине твердых пород и сельскохозяйственных отходах, является ксилоза, полученная из гемицеллюлоз ксиланов. Ксилоза относительно легко восстанавливается кислотным или ферментативным гидролизом, но может быть сброжена в этанол лишь немногими природными организмами или рекомбинантными микробами.

Чтобы избежать разрушения сахаров лигноцеллюлозных материалов кислотной обработкой, применяется ферментативный гидролиз с использованием смесей ферментов (целлюлаз и гемицеллюлаз). Эти ферменты в сочетании с эффективной предварительной обработкой лигноцеллюлозы обеспечивают высокий выход глюкозы, ксилозы и других сбраживаемых сахаров с минимальными потерями сахара. Однако в настоящее время эти ферменты слишком дороги для использования в крупномасштабной переработке лигноцеллюлозных материалов в субстраты для ферментации.

Крахмал – основной источник углеводов в растениях. Кукурузный крахмал в настоящее время служит основным сырьем для производства крахмального этанола, пластика, упаковочных материалов, клеев и других промышленных продуктов. Крахмал представляет собой высокомолекулярное соединение класса полисахаридов, построенное из множества молекул глюкозы. Под действием кислоты либо ферментативного расщепления посредством амилазы крахмал преобразуется в патоку — сложную смесь, включающую декстрины, мальтозу (обладающую сладким вкусом) и различную окраску от белой до темно-коричневой вследствие процесса карамелизации. Основным продуктом кислого гидролиза — глюкоза. Продукты распада крахмала используются для производства спирта.

Целлюлоза – углеводный полимер, состоящий из глюкозы и составляющий около 45% древесных частей растений. Это полисахарид с высокой степенью полимеризации, служащий основным компонентом клеточных стенок растений. Клетчатка образована большим количеством

глюкозных остатков (от 2 до 10 тысяч единиц, примерно), соединенных прочными связями друг с другом. Ее молекулярная масса составляет около 2 миллионов дальтон и даже больше. Содержание клетчатки в плодах колеблется в среднем от 0,5 до 2%, в овощах – от 0,2 до 2,8%. Количество клетчатки в разных тканях плодов и овощей неодинаково. Например, в покровных тканях (кожице, кожуре), а также в элементах семенных камер плодов ее во много раз (10 и более) больше, чем в паренхимных (мякоти). Целлюлозу можно выделить методом варки целлюлозы, а затем подвергнуть дальнейшей переработке для получения таких химических веществ, как этанол и эфиры целлюлозы, ацетат целлюлозы, вискоза и нитрат целлюлозы, целлофан и другие целлюлозные материалы.

Для химического производства можно использовать множество источников целлюлозной массы. Основным источником древесной целлюлозы являются хвойные породы деревьев. Льняные отходы (льняная пакля) и кенаф выращиваются в коммерческих целях для производства целлюлозы. В других странах целлюлозу производят из сельскохозяйственных отходов, таких как солома и жом сахарного тростника. Благодаря своему преобладающему содержанию в растениях, целлюлоза всегда будет основным сырьем для любой биотехнологической промышленности.

Гемицеллюлоза. Гемицеллюлозы состоят из углеводов, в основе которых лежат пентозы (главным образом ксилоза), а также гексозы (главным образом глюкоза и манноза). Гемицеллюлоза является компонентом клеточных оболочек растений. Она не растворяется в воде, однако способна растворяться в щелочах и подвергаться гидролизу в менее концентрированных кислых растворах. Гемицеллюлозы включают остатки либо гексоз (гексозаны), либо пентоз (пентозаны). Среди плодов и овощей широко представлен пентозан арабан, построенный из множества молекул арабинозы. Гемицеллюлозы составляют от 25 до 35% сухой массы древесины и сельскохозяйственных отходов; по распространённости среди углеводов они уступают только целлюлозе. Хотя использование гемицеллюлозы в настоящее время ограничено, гемицеллюлозы, пектины и различные другие растительные полимеры в большом количестве присутствуют в отходах и обладают большим потенциалом для производства химикатов и материалов.

Лигнин – это фенилпропановый полимер, связывающий целлюлозу и гемицеллюлозу в древесных растениях. Лигнин составляет около 15–25% массы лигноцеллюлозы. Лигнин до сих пор не использовался в качестве сырья для промышленного применения в больших количествах. Целенаправленные попытки исследовательских лабораторий целлюлозно-

бумажной промышленности освоить новые рынки для побочных продуктов лигнина имели лишь ограниченный успех. Производство низкомолекулярных соединений из сульфатного лигнина (в частности, фенолов) также пока не оказалось коммерчески конкурентоспособным. Это отражает сложность химического состава лигнина и его устойчивость к деполимеризации.

Пектин. Пектин представляет цепочку соединенных между собой остатков галактуроновой кислоты; протопектин – различным образом связанные цепочки метилированных полигалактуроновых кислот. Протопектин образует комплексы с гемицеллюлозами и клетчаткой. Он нерастворим в воде, но довольно легко подвергается кислотному и ферментативному гидролизу до пектина. Основная особенность пектиновых веществ (пектина) – образовывать желе в присутствии необходимого количества сахара и кислоты. Это учитывают при получении желе, джема, мармелада, конфитюра, пастилы. При созревании плодов происходят характерные изменения пектиновых соединений. Протопектин межклеточных перегородок словно скрепляет клетки растительного организма. Во время процесса созревания протопектин превращается в растворимую форму пектина, содержащегося в клеточном соке, вследствие чего меняется структура и плотность плода.

Растительные белки. Белки являются основным средством выражения генетической информации, закодированной в ДНК. Эти полимеры основаны на строительных блоках – мономерах аминокислот, последовательность которых predetermined генетическим шаблоном. Разнообразие последовательностей белков обуславливает широкий спектр функций, выполняемых белками в живых организмах: служат катализаторами биохимических реакций (ферменты), выполняют структурную функцию, выполняют роль запасных питательных веществ. Различные растительные белки могут когда-нибудь найти коммерческое применение в качестве материалов, но современное понимание структурных свойств большинства растительных белков ограничено. Одним из немногих хорошо изученных растительных белков является зеин, широко распространенный белок в семенах кукурузы. Зеин составляет 39% белка зерна, или около 4% от его веса. Этот белок обладает рядом свойств, представляющих промышленный интерес, например, способностью образовывать прочные, блестящие, жиро- и износостойкие волокна, и пленки. Зеин устойчив к воздействию микробов и обезвреживается формальдегидом, становясь практически инертным. Кроме того, он нерастворим в воде и термопластичен.

Растительные масла. Многие культуры могут служить источниками растительных масел; в настоящее время соевые бобы составляют 75

процентов растительного масла, производимого в мире. Соевые культуры являются основным объектом исследований растительных масел. Около 152 тысяч тонн соевого масла были использованы в производстве кормов для сельскохозяйственных животных. Жирные кислоты, полученные из соевого масла, перерабатываются в поверхностно-активные вещества, эмульгаторы и алкидные смолы для красок.

4.3. Ферментативная переработка растительного сырья

4.3.1. Гидролитические процессы.

Гидролиз крахмала происходит под действием амилолитических ферментов. К этой группе относятся α - и β -амилазы, глюкоамилаза, пуллуланаза, изоамилаза.

Амилазы очень широко распространены в природе. Они синтезируются многими микроорганизмами (бактерии, грибы, актиномицеты, дрожжи) и растениями. До развития ферментной промышленности главным промышленным источником получения амилаз в европейских странах было проросшее зерно (солод). В настоящее время главным источником амилаз являются микроорганизмы, особенно бактерии, грибы и реже дрожжи.

Амилазы бывают двух типов: эндо- и экзоамилазы. Четко выраженной эндоамилазой является α -амилаза, способная к разрыву внутримолекулярных связей с высокополимерными цепями субстрата.

Глюкоамилаза и β -амилаза являются экзоамилазами, то есть ферментами, атакующими субстрат с нередуцирующего конца.

Субстратом для действия амилаз является крахмал. Крахмал неоднороден и имеет различные характеристики по степени полимеризации гликозидной цепи и количеству ветвлений.

Крахмал - растительный полисахарид с очень сложным строением. Это двухкомпонентное соединение, состоящее из 13-30% амилозы и 70-85% амилопектина. Оба компонента неоднородны, их молекулярная масса колеблется в широких пределах и зависит от природы крахмала. Амилоза - это неветвящийся полимер, в котором остатки глюкозы соединены α -1,4-гликозидной связью; степень полимеризации около 2000. В «аномальных» амилозах с одной-двумя α -1,6-связями полимеризация может возрасти до 6000. Амилопектин имеет большую молекулярную массу, чем амилоза, и более сложное строение. Это ветвящийся полисахарид. Возможно, он ветвится дихотомически, то есть число концевых звеньев на единицу больше звеньев, дающих ветвление. Существует также мнение, что цепи

амилопектина не раздваиваются, а образуют симметричные тройные разветвления. Тогда молекула приобретает продолговато-кустистую форму, обладающую большей компактностью в пространстве. Молекула амилопектина - одна из самых крупных молекул, ее молекулярная масса $\approx 5 \cdot 10^8$. Ветвление гликозидной цепи осуществляется с помощью α -1,6-связей, количество которых составляет 4-5 % суммы α -1,4- и α -1,6-связей в амилопектине. В состав амилопектина входит от 0,012 до 0,111% фосфора, который, по-видимому, присоединяется к шестому углеродному атому в глюкозном остатке.

Амилоза и амилопектин в растениях формируются в крахмальные зерна-гранулы.

Реакции, катализируемые амилазами, имеют две стадии: короткую – предстационарную, и длительную – стационарную. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя смесь линейных и разветвленных олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается, пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться йодом; он протекает значительно медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы. Поэтому конечные продукты гидролиза α -амилазами могут быть различными. Первая стадия воздействия фермента на субстрат, хотя и носит неупорядоченный характер, имеет для всех видов α -амилаз схожий механизм.

Существует две гипотезы о механизме действия экзоамилаз на субстрат. Первая гипотеза предполагает, что, воздействуя на субстрат по одноцепочному или «молнеобразному» механизму, экзоамилаза образует фермент-субстратный комплекс с захватом нередуцирующего конца цепи. Дальнейшее продвижение фермента по этой цепи происходит до полного ее гидролиза. По второй гипотезе β - и глюкоамилаза действуют на субстрат путем механизма множественной атаки, то есть фермент образует комплекс с молекулой субстрата, затем через несколько этапов этот комплекс распадается, и фермент связывается с новой молекулой субстрата. Иными словами, при множественной атаке происходит нечто среднее между неупорядоченным механизмом и одноцепочечной, «молнеобразной» атакой.

α -Амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1) является эндоамилазой, вызывающей гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей внутри высокополимеризованного субстрата. α -Амилаза - водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина и имеющий молекулярную массу, равную 45000-60000. В зависимости от вида микроорганизма свойства α -амилаз могут сильно отличаться не только по механизму воздействия на субстрат и конечным продуктам, но и по

оптимальным условиям для проявления максимальной активности. Действуя на целое крахмальное зерно, α -амилаза атакует его, разрыхляя поверхность и образуя каналы и бороздки, то есть как бы раскладывает зерно на части. Клейстеризованный крахмал гидролизуетея ею с образованием не окрашиваемых йодом продуктов - в основном низкомолекулярных декстринов. Процесс гидролиза крахмала многостадийный. В результате воздействия α -амилазы на первых стадиях процесса в гидролизе накапливаются декстрины, затем появляются не окрашивающиеся йодом тетра- и тримальтозы, которые очень медленно гидролизуются α -амилазой до ди- и моносахаридов.

Все α -амилазы проявляют наименьшее сродство к гидролизу концевых связей в субстрате. Некоторые же α -амилазы, особенно грибного происхождения, на второй стадии процесса гидролизуют субстрат более глубоко с образованием небольшого количества мальтозы и глюкозы.

β -Амилаза (α -1,4-глюканмальтогидролаза, КФ 3.2.1.2) - активный белок, обладающий свойствами альбумина. β -Амилаза - экзофермент концевое действие, проявляющий сродство к предпоследней α -1,4-связи с нередуцирующего конца линейного участка амилозы и амилопектина. Каталитический центр фермента содержит сульфгидрильные и карбоксильные группы и имидозольный цикл остатков гистидина. В отличие от α -амилазы β -амилаза практически не гидролизует нативный крахмал, тогда как клейстеризованный крахмал гидролизуетея ею с образованием мальтозы в β -конфигурации, поэтому данная амилаза по аналогии с α -амилазой называется β -амилазой. Если гидролизу подвергается амилоза, то гидролиз идет полностью до мальтозы. Незначительное количество декстринов может образоваться при гидролизе «аномальных» амилоз, так как гидролиз β -амилазой идет только по линейной цепи до α -1,6-связей. Если субстратом для β -амилазы служит амилопектин, то гидролиз идет в значительно меньшей степени. β -Амилаза отщепляет фрагмент с нередуцирующего конца участка от внешних линейных ветвей, имеющих по 20-26 глюкозных остатков, с образованием 10-12 молекул мальтозы. Гидролиз приостанавливается на предпоследней α -1,4-связи, граничащей с α -1,6-связью. В гидролизе накапливается 54-58% мальтозы, остальное составляет высокомолекулярные декстрины, содержащие значительное количество α -1,6-связей - так называемые β -декстрины.

β -Амилазы проявляют большую стабильность в отсутствии ионов Ca^{2+} . Молекулярная масса β -амилазы растений достаточно высока, она составляет от 50000 до 200000. Фермент может состоять из одной или четырех субъединиц до 50000 каждая. Фермент содержит SH-группы и чувствителен

к действию тяжелых металлов. Считается, что β -амилаза обладает высокой способностью к множественной атаке субстрата. Для амилозы средней молекулярной массы в одном присоединении фермента к субстрату возможно отщепление до четырех остатков мальтозы. При увеличении молекулярной массы субстрата возможно и большее количество мест атаки.

До середины 70-х годов единственным источником β -амилазы считались растения, особенно прорастающее зерно (солод). В настоящее время для производства мальтозы и крахмала применяют бактериальные β -амилазы.

Глюкоамилаза (α -1,4-глюканглюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) катализирует последовательное отщепление концевых остатков α -D-глюкозы с нередуцирующим концом субстрата. Это фермент с экзогенным механизмом воздействия на субстрат. Многие глюкоамилазы обладают способностью так же быстро, как и α -1,4-связь, гидролизовать α -1,6-глюкозидные связи. Но это происходит только в том случае, когда за α -1,6-связью следует α -1,4-связь, поэтому декстран ими не гидролизуется. Отличительной особенностью глюкоамилаз является способность в десятки раз быстрее гидролизовать высокополимерный субстрат, чем олиго- и дисахариды. Она синтезируется многими микроорганизмами и в литературе известна под различными названиями: амилоглюкозидаза, γ -амилаза, лизосомальная α -глюкозидаза, кислая мальтоза, матулаза, и экзо-1,4- α -глюкозидаза.

Механизм атаки субстрата глюкоамилазой может быть двух типов: либо одноцепочечный, либо множественной атаки.

Глюкоамилазы являются гликопротеидами, содержащими от 5 до 35% углеводов, которые состоят из олиго-, ди- и моносахаридов. Углеводный компонент может быть целостным фрагментом или же разбитым на индивидуальные соединения, которые прикрепляются к белку через треонин и серин. Например, у глюкоамилазы *A. niger* их 20. Большинство известных глюкоамилаз имеет оптимум рН при 4,5-5,2, реже - при 5,7-6,0, в основном для дрожжевых глюкоамилаз. рН-стабильность микробных глюкоамилаз лежит в широком диапазоне - от 2,5 до 9. Термостабильность глюкоамилаз находится в интервале от 30 до 45°C. Глюкоамилазы различного происхождения заметно отличаются по молекулярной массе, которая, по данным различных авторов, имеет значения от 48000 до 210000. При росте культуры параллельно накапливаются и другие амилазные ферменты, обладающие не только гидролитическим, но и трансферазным действием. Это глюкозилтрансфераза и α -амилаза. В случае, если система открытая и продукт гидролиза (глюкоза) постоянно удаляется из системы, процесс может дойти до полного гидролиза крахмала до глюкозы. Если же система

закрытая и концентрация субстрата велика, то при достижении определенной концентрации глюкозы в реакционной среде в результате переноса глюкозильных остатков на глюкозу, ди- и олигосахариды начинают накапливаться изомальтоза, паноза, нигероза, изомальтотриоза и другие сахара, которые имеют горький вкус. В результате процесс не может идти до полного превращения крахмала в глюкозу. Глюкоамилаза может проявлять небольшую трансферазную активность, но только при концентрации глюкозы свыше 60-70%.

Пуллуланаза (пуллулан-6-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.41) ранее была известна под несколькими названиями: R-фермент; дебранчинг-фермент, предельная декстриназа или аминопектин-6-глюканогидролаза. Как и α -амилаза, пуллуланаза является эндогенным ферментом, но в отличие от последней способна неупорядоченно гидролизовать α -1,6-связи в пуллулане, аминопектине и предельных декстринах, получаемых при совместном воздействии на крахмал α - и β -амилаз. Мальтотриоза является наиболее частым отщепляемым фрагментом.

Если между двумя α -1,6-связями расположено более трех остатков глюкозы, то процесс разрыва α -1,6-связей идет значительно медленнее, поэтому аминопектин хуже других ветвящихся полисахаридов гидролизуется пуллуланазой. Атакуемость несколько возрастает, если происходит нарушение вторичной структуры полимерной цепи полисахарида.

Изоамилаза (гликоген-6-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.68), или дебранчинг-фермент, гидролизует α -1,6-связи в ветвящихся субстратах, таких как аминопектин, β -предельные декстрины. Отличительной особенностью изоамилазы по сравнению с пуллуланазой является то, что она не способна гидролизовать пуллулан и слабо действует на предельные α -декстрины. Этот фермент образуют многие микроорганизмы, такие как *B. amyloliquefaciens*, *Cytophaga*, *Streptomyces*, *Pseudomonas amyloclavata*, *Saccharomyces cerevisiae* и др., ферменты которых обладают способностью гидролизовать субстрат при pH от 3,5 до 6,5 и температурах от 25 до 52°C. Изоамилаза не стабилизируется кальцием, за исключением фермента *Cytophaga*, и ингибируется *n*-хлормеркурийбензоатом. Молекулярная масса изоамилаз различна - от 90000 до 120000.

Гидролиз пектиновых веществ происходит под действием пектолитических ферментов.

Пектиновые вещества - высокомолекулярные соединения, обладающие свойствами лиофильных коллоидов. Пектиновые вещества подразделяются на несколько групп: протопектин - не растворимое в воде соединение сложного химического строения; пектиновая кислота - полигалактуроновая

кислота в малой степени этерифицированная остатками метанола; пектин - почти полностью этерифицированная пектиновая кислота; пектовая кислота - полигалактуронозная кислота; пектинаты - соли пектиновой кислоты и пектаты - соли пектовой кислоты. Пектиновые вещества представляют собой полисахариды, состоящие из остатков D-галактуронозной кислоты, связанные α -1,4-связью. Они могут быть метоксилированы по шестому углеродному атому. Предельная степень этерификации 16,2%, обычно в пектине она не превышает 14,9-15,2%. Все пектиновые вещества, кроме протопектина, растворимы в воде. строение протопектина точно не установлено, это водонерастворимый «материнский» полиуронид, в состав которого входят пектиновые цепочки и молекулы целлюлозы, ионы Ca, Mg, остатки фосфорной, уксусной кислот, сахара и т. д. В присутствии сахара, кислоты и под действием поливалентных ионов металлов пектины образуют гель. Молекулярная масса пектинов, выделенных из различных объектов, изменяется в пределах от 20000 до 200000.

Пектиназы образуют многие микроорганизмы (микроскопические грибы, бактерии и некоторые виды дрожжей). Наибольшей продуцирующей способностью обладают микроскопические грибы особенно различные виды рода *Aspergillus*: *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. terreus* и др. Способность к биосинтезу пектиназ отмечается у представителей родов *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Trichothecium*, *Fusarium* и некоторых других. Среди бактерий найдены активные продуценты пектиназ, относящиеся к роду *Clostridium*, а также отмечается способность к образованию пектиназ у некоторых бактерий, относящихся к видам *Bacillus polymyxa*, *B. falseneus*, *Klebsiella aerogenes*, и некоторых других. Среди дрожжей пектолитические ферменты образует культура *Saccharomyces fragilis*.

Пектиназы содержат многие растения, но они не являются промышленными источниками получения ферментов.

Все пектиназы условно можно разделить на две группы: гидролаза и трансэлиминазы. К гидролазам относят пектинэстеразу и полигалактурононазу.

Пектинэстераза (ПЭ). Пектинметилэстераза (КФ 3.1.1.11) представляет собой гидролазу эфиров карбоновых кислот. В зависимости от источника получения препарата пектинэстеразы отличаются по оптимальному рН. Так, микробная пектинэстераза имеет оптимальный рН от 4,5 до 5,5, а полученная из растений - 6,0-8,0. Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} активируют пектинэстеразы. Фермент омыляет сложные эфирные связи в пектиновой кислоте и пектине и отщепляет метиловый спирт. Установлено, что пектинэстераза отщепляет CH_3 -группу только в том случае, когда в непосредственной близости к омыляемой связи находится хотя бы одна $COOH$ -группа. Отщепление CH_3 -

групп происходит последовательно, начиная от свободной COOH-группы. В результате пектинэстеразы накапливаются частично или полностью деметоксилированная полигалактуронозная кислота и метиловый спирт.

Полигалактуроназа (ПГ). Полигалактуронидгликоногидролаза (КФ 3.2.1.15) осуществляет гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей в цепи пектиновых веществ. В растениях полигалактуроназа встречается редко и в небольших количествах. Она продуцируется микроорганизмами, особенно грибами и бактериями. Полигалактуроназа многокомпонентна и проявляет большую специфичность к субстрату. По субстратной специфичности ферментов к разрушаемым пектинам различают четыре типа полигалактуроназ: 1) полиметилгалактуроназы (ПМГ) - ферменты, действующие на метоксилированную полигалактуронозную кислоту (пектин); они делятся на две подгруппы: эндополиметилгалактуроназа I типа (эндо-ПМГ-I) и экзополиметилгалактуроназа III типа (экзо-ПМГ-III); 2) полигалактуроназы (ПГ) - ферменты, действующие на пектовую или пектиновую кислоту; они также разделены на две подгруппы: эндополигалактуроназа II типа (эндо-ПГ-II) и экзополигалактуроназа IV типа (экзо-ПГ-IV).

Эндо-ПМГ-I является разжижающим ферментом; он гидролизует нативный высокоэтерифицированный пектин тем быстрее и эффективнее, чем выше степень его этерификации. Присутствие пектинэстеразы в растворе снижает активность эндо-ПМГ-I. Этот тип фермента широко распространен среди грибов, особенно у видов *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa*, *A. awamori* и др.

Экзо-ПМГ-III является осахаривающим ферментом конечного действия, отщепляющим по одному остатку галактуронозной кислоты от пектиновой кислоты или пектина. Фермент проявляет сродство к метоксилированному остатку галактуронозной кислоты, гидролизуя концевую α -1,4-связь между двумя остатками галактуронозных кислот, которые имеют COOCH₃-группу.

Эндо-ПГ-II - разжижающая полигалактуроназа, которая гидролизует пектиновую или пектовую кислоту. Она действует только при наличии в пектиновом веществе свободных COOH-групп. Место разрыва полигалактуронозной цепи эндо-ПГ-II определяется наличием свободных COOH-групп. Воздействие эндо-ПГ-II на субстрат значительно возрастает при наличии в реакционной среде пектинэстеразы.

Фермент синтезируется грибами и бактериями.

Экзо-ПГ-IV проявляет сродство к концевой гликозидной связи в молекуле пектиновой или пектовой кислоты, вблизи которой нет CH₃-

группы. Для образования фермент-субстратного комплекса необходимо наличие свободных СООН-групп вблизи разрываемой связи.

Гидролиз целлюлозы происходит под действием целлюлолитических ферментов. Целлюлоза является высокополимерным полисахаридом растений, состоящим из остатков глюкозы, соединенных между собой β -1,4-глюкозидными связями. Целлюлоза - линейный полимер. Большинство остатков глюкозы в целлюлозе содержит три свободных гидроксила у 2, 3 и 6-го углеродных атомов, которые являются основой для образования водородных связей и формирования прочных волокон. В среднем одна нить целлюлозы состоит из 6000-12000 глюкозных остатков с молекулярной массой около $1 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^6$. Объединенные в группы нитевидные молекулы целлюлозы называются микрофибриллами.

В микрофибрилле нити целлюлозы могут быть упакованы параллельно, с множеством водородных и других связей - это «кристаллиты»; участки, где нет строгой упорядоченной структуры, называют аморфными. Аморфные участки целлюлозы легче подвергаются внешнему воздействию: с увеличением количества таких участков растут набухаемость целлюлозы, ее атакуемость ферментами, падает прочность и т. д. Целлюлоза является не растворимым в воде субстратом. Нативная целлюлоза, особенно с высокой степенью кристалличности, медленно и плохо атакуется целлюлазами. Поэтому целлюлозу для ферментативного гидролиза надо подвергать предварительной обработке. Для этого применяют измельчение с помощью вальцевания материала в различных типах мельниц, химические способы обработки кислотами и щелочами, методы физической обработки и т. д. В связи с этим при характеристике целлюлолитических ферментов обязательно учитывают состояние субстрата - целлюлозы.

Различают два вида целлюлозы: нативная - ничем не обработанная целлюлоза, которая полностью сохранила исходное строение и структуру микрофибрилл (хлопок, фильтровальная бумага), и так называемая модифицированная, частично обработанная целлюлоза, в которой нарушены водородные связи и фибриллярная структура волокна.

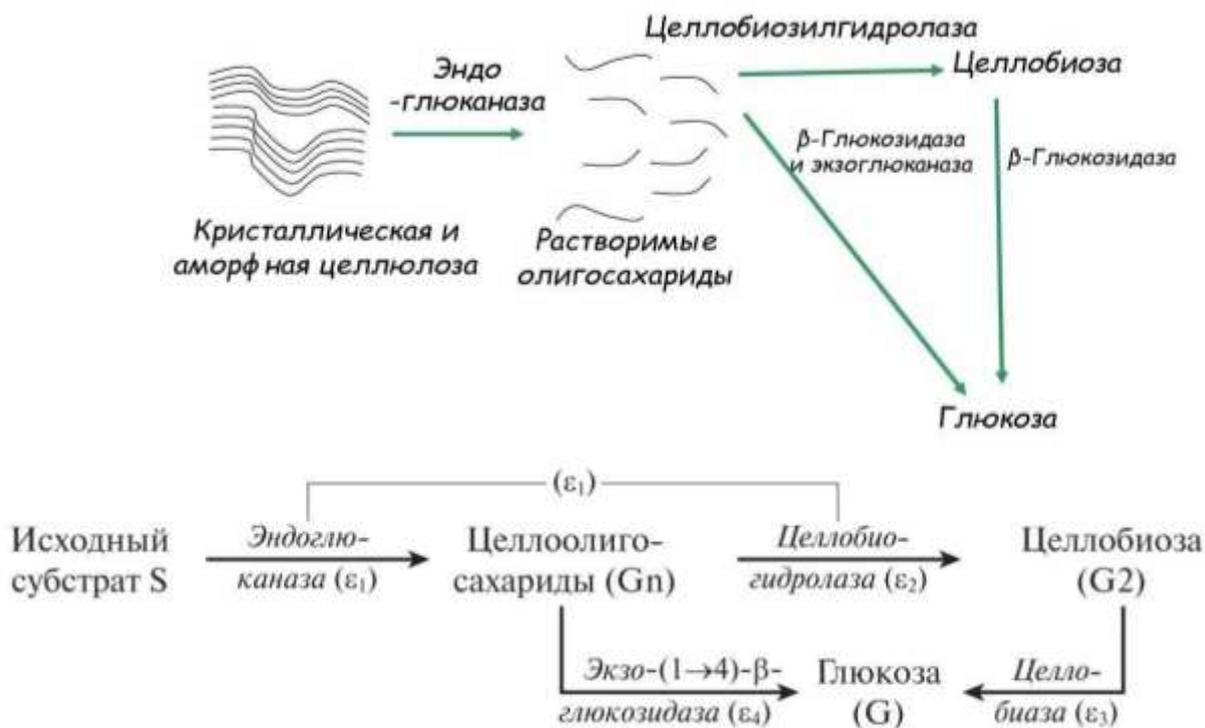


Рис. 3 – Схема ферментативного гидролиза целлюлозы

Целлюлазы почти исключительно синтезируются только микроорганизмами, а именно анаэробными бактериями рода *Clostridium*, микроскопическими грибами и другими. Целлюлоза разрушается представителями многих родов микроорганизмов - *Alternaria tenuis*, *Aspergillus amstelodamy*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Cellovibrio gilvus*, *Cephalosporium sacchariticus*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Jrpex lacteus*, *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium notatum*, *P. variable*, *Rhizopus oryzae*, *Stachybotrys alternans*, *Trichoderma koningii*, *T. lignorum*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *Geotrichum candidum*, *Cytophaga* и др.

В соответствии с Номенклатурой ферментов к комплексу целлюлаз, участвующих в деструкции целлюлозы, относят:

1) 1,4- β -D-глюкан-4-глюканогидролазы (КФ 3.2.1.4). Это эндоглюканаза, способная неупорядоченно гидролизовать в целлюлозе, лихенине и β -глюканах зерна β -1,4-связи, помимо целлоолигосахаридов могут образовываться в реакционной среде глюкоза и целлотриозы;

2) 1,4- β -D-глюканглюкогидролаза (КФ 3.2.1.74). Это экзо-1,4- β -глюкозидаза, которая гидролизует 1,4-связи в 1,4- β -D-глюканах с последовательным отщеплением глюкозных остатков;

3) 1,4- β -D-глюканцеллобиогидролаза (КФ 3.2.1.91). Это целлобиогидролаза, которая отщепляет целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов;

4) β -D-глюкозидглюкогидролаза (КФ 3.2.1.21). Это β -глюкозидаза, или целлобиаза, которая гидролитически отщепляет концевые нередуцирующие остатки β -D-глюкозы с освобождением молекулы глюкозы.

Характерными особенностями целлобиогидролазы являются способность гидролизовать нерастворимую целлюлозу с образованием целлобиозы и неспособность этого фермента уменьшать вязкость растворов карбоксилметил (КМ-) целлюлозы.

Большинство целлобиогидролаз является гликопротеидами, они содержат до 9% нейтральных углеводов, состоящих в основном из маннозы, небольшого количества глюкозы, галактозы и глюкозамина.

Молекулярные массы известных экзоглюканаз достаточно близки друг к другу и составляют 45000-48000, но есть и более крупные молекулы - с M_m 62000-90000.

Отличительным свойством экзо-1,4- β -глюканазы является образование α -аномерной формы глюкозы. Для многих целлюлазных комплексов этот фермент играет существенную роль в механизме образования глюкозы из целлюлозосодержащего сырья. Именно экзо-1,4- β -глюкозидаза, а не целлобиаза играет доминирующую роль в образовании глюкозы (60-98% общего ее количества).

Целлобиаза очень широко распространена в животном, растительном мире и у микроорганизмов. Этот фермент хорошо изучен. Ему приписываются регуляторные функции и влияние именно β -глюкозидаз на суммарное действие всего комплекса целлюлаз.

Отличительной особенностью целлобиаз является способность сохранять пространственную конфигурацию расщепляемой связи в продуктах гидролиза. Среди β -глюкозидаз существуют ферменты, способные расщеплять β -1,2-, β -1,3-, β -1,4- и β -1,6-связи в субстрате.

Молекулярная масса β -глюкозидаз, по различным данным, колеблется от 40000 до 400000. Есть мнение, что β -глюкозидазы относятся к олигомерным белкам, которые диссоциируют на низкомолекулярные компоненты по схеме $(8n) \rightleftharpoons 2(4n) \rightleftharpoons 4(2n) \rightleftharpoons 8n$. Отмечается, что с уменьшением молекулярной массы фермента возрастает его сродство к субстрату и соответственно уменьшается k_m . Октамерное строение фермента подтверждается электронной микроскопией.

Многие β -глюкозидазы являются гликопротеидами и кислыми белками. Максимальную активность эти ферменты проявляют в кислой зоне при рН от 4,3 до 5,0, реже - при 6,7; оптимальная температура действия лежит в диапазоне значений от 37 до 45°C.

Гидролиз гемицеллюлозы происходит под действием гемицеллюлолитических ферментов.

Гемицеллюлозами в отличие от целлюлоз называются те полисахариды клеточных оболочек, которые растворяются в концентрированных щелочах (17%-й раствор NaOH и 24 %-й KOH). Гемицеллюлозы наряду с пектиновыми веществами образуют основное вещество (матрикс) клеточных оболочек. Из всех гемицеллюлоз только очень немногие виды ксиланов, глюканов и маннанов имеют фибриллярное строение, например, глюкоманнаны некоторых водорослей. Остальные же гемицеллюлозы имеют ветвистое строение и поэтому не могут образовывать фибриллы. Эта группа полисахаридов, разнородная по строению, молекулярной массе и составу, при гидролизе дает довольно разнообразный набор соединений: глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу, ксилозу, арабинозу, глюкуроновую и галактуоновую кислоты.

Последовательность соединения отдельных остатков сахаров в гемицеллюлозах стерически близка, например, глюкоза - глюкуроновая кислота - ксилоза и галактоза - галактуоновая кислота - арабиноза. В урановых кислотах первичная спиртовая группа может быть окислена в карбоксильную, которая может декарбоксилироваться и давать начало для образования пентоз и пентозанов. Этим объясняется образование галактоарабанов, глюкуроноксианов, галактоманнанов, глюкуроноарабиноксианов и т. д.

Аморфная структура этих полисахаридов объясняется тем, что наряду с β -1,4-связью, лежащей в основе образования линейных полимеров в молекулах гемицеллюлоз довольно часто встречаются ответвления от основной цепи по β -1,3- и β -1,6-связям, что дает начало образованию ветвящихся и спиральных структур. Кроме того, включение в состав соединения урановых кислот влечет за собой возрастание гидратационных свойств, что делает невозможным образование кристаллических структур в водной среде. К гемицеллюлозам многие относят только глюканы, ксиланы и арабаны, а вещества, содержащие маннозу, фруктозу, галактозу и галактуоновую кислоту, - к слизевым веществам, гумми- и пектиновым веществам. Неустойчивость трактовки понятия «гемицеллюлозы» связана со сложностью их строения и трудностью фракционирования на индивидуальные вещества.

Главное различие гемицеллюлоз и гумми-веществ заключается в том, что истинные гемицеллюлозы растворимы только в щелочах, а гуммивещества растворяются также в теплой воде, образуя вязкие растворы.

Все гемицеллюлозные вещества делят на две группы: β -глюканы и пентозаны.

β -Глюканы. Эти вещества являются высокомолекулярными полимерами и при полном гидролитическом расщеплении образуют одну глюкозу. β -Глюканы широко распространены в природе. Они входят в состав многих растений, водорослей, мхов, лишайников и микроорганизмов. По структуре β -глюканы могут быть линейными и разветвленными. β -Глюканы ячменя представляют почти линейные полисахариды, где остатки глюкозы примерно на 70 % соединены β -1,4- и β -1,3-связями (около 30 %), которые могут быть в цепи только одиночными.

В природе существуют разветвленные β -глюканы, имеющие β -1,6-глюкозидные связи. К таким β -глюканам относятся ламинарии и пахиман. Есть β -глюканы со всеми видами связей: β -1,3-; β -1,4- и β -1,6. Один из таких β -глюканов получил название курулан. Молекулярная масса β -глюканов варьирует в широких пределах - от 2000 до 20000.

Пентозаны. Пентозаны имеют ветвистое строение, они состоят из остатков ксилоз, арабиноз и небольшого количества остатков галактуроновой кислоты. Основной тип связей - β -1,4-, а в местах ветвления - β -1,3-связь. В концевой цепи ветвлений могут быть остатки арабинозы. Молекулярная масса пентозанов различна, она может варьировать от 7900 ± 500 до 58800 ± 200 .

Многие микроорганизмы образуют ферменты, гидролизующие такие гемицеллюлозы, как β -глюкан, ксиланы и их производные. β -Глюканазы образуются грибами, бактериями и дрожжами, синтезирующими целлюлазы, причем спороносные бактерии *B. subtilis* и *B. mesentericus* синтезируют из комплекса гемицеллюлаз только β -глюканазы, что снижает их практическую значимость. Продуцентами ксиланаз являются грибы, актиномицеты, бактерии, дрожжи. Наивысшей продуцирующей способностью обладают грибы, относящиеся к родам *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* и особенно виды рода *Aspergillus*. β -Глюкозидазы образуют бактерии, дрожжи, грибы. Наиболее активными продуцентами β -глюкозидаз являются грибы, принадлежащие к родам *Trichoderma* и *Aspergillus*.

Все гемицеллюлазные ферменты делят на три группы: β -D-глюканазы, β -ксиланазы и β -глюкозидазы.

β -D-Глюканазы. К β -D-глюканазам относят систему ферментов, катализирующую расщепление β -глюканов с β -1,2-, β -1,3-, β -1,4- и β -1,6-связями. Согласно Номенклатуре ферментов (1979) в нее входят шесть энзимов:

1,4-(1,3:1,4)- β -D-глюкан-4-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.4). Это фермент, который имеет рабочее название целлюлаза, или эндо-1,4- β -глюканаза. Он гидролизует β -1,4-глюкозидные связи в целлюлозе, лишенине, β -глюканах зерна. Для этого фермента наличие в субстрате β -1,3-связей не является препятствием. Разрыв связей происходит беспорядочно в определенном удалении от концов молекулы, то есть этот фермент имеет эндогенный механизм воздействия на субстрат;

1,3-(1,3:1,4)- β -D-глюкан-3(4)-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.6). Этот фермент имеет рабочие названия: эндо-1,3(4)- β -глюканаза, ламинариназа, эндо-1,3-глюканаза. Фермент эндогенно катализирует гидролитическое расщепление внутренних β -1,3- или β -1,4-связей в β -глюканах, у которых глюкозный остаток, чья редуцирующая группа участвует в образовании гидролизуемой связи, сам замещен в положении C₃. Субстратом для действия этого фермента являются ламинарии, лишенин и β -глюканы зерна;

1,3- β -D-глюканглюканогидролаза (КФ 3.2.1.39). Этот фермент называется, как и предыдущий, эндо-1,3- β -глюканазой, ламинариназой. Но у него есть некоторые отличия от фермента КФ 3.2.1.6. Он гидролизует преимущественно 1,3- β -глюкозидные связи в 1,3- β -D-глюканах и очень ограниченно гидролизует эти же связи в глюканах, где есть β -1,3-, так и β -1,4-связи. Этот фермент гидролизует в основном ламинарии, парамилон и пахиман;

1,3-1,4- β -D-глюкан-4-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.73). Этот фермент имеет рабочее название лихеназа; он гидролизует 1,4- β -D-глюкозидные связи в β -D-глюканах, имеющих 1,3- и 1,4-связи. Фермент гидролизует лишенин и β -D-глюканы зерна, но не действует на β -D-глюканы, содержащие только β -1,3- или β -1,4-связи.

1,6- β -D-глюканглюканогидролаза (КФ 3.2.1.75). Этот фермент в литературе известен как под названием эндо-1,6- β -глюканаза. Он беспорядочно гидролизует β -1,6-связи внутри молекулы субстрата. Субстратом для действия фермента являются 1,6- β -D-глюканы, такие как лютеан, пустулан и 1,6-олиго- α -D-глюкозиды;

1,2- β -D-глюканглюканатглюканогидролаза (КФ 3.2.1.71). Рекомендуемое название этого фермента эндо-1,2- β -глюконаза. Его отличительной особенностью является каталитическое расщепление внутримолекулярных β -1,2-связей в 1,2- β -D-глюканах.

β -D-Глюканазы- весьма разнородный комплекс ферментов, составляющие которого отличаются по многим признакам. Молекулярные массы, изоэлектрические точки, гидролитические способности этих ферментов, по данным различных исследователей, сильно различаются.

Молекулярная масса эндо-1,4-β-глюконаз находится в пределах 20 000-70 000; по другим данным эндо-1,3-β-глюконазы имеют молекулярные массы от 16 000 до 60 000.

Все β-глюканазы являются кислыми белками, содержащими большое количество дикарбоновых кислот и оксиаминкислот. Эти ферменты являются гликопротеидами, они имеют углеродный фрагмент, содержащий маннозу, галактозу, глюкозу.

β-Глюконазы, особенно микроскопических грибов, имеют множественные формы, отличающиеся по способу гидролиза субстратов, субстратной специфичности, набору аминокислот, структуре самой молекулы, молекулярной массе, оптимальному рН, изоэлектрическим точкам и т.д.

Объединяет же всю эту группу их способность к гидролитическому расщеплению внутримолекулярных гликозидных связей в β-глюканах различного происхождения.

β-Ксиланазы. К ним относится система ферментов, катализирующих расщепление β-гликозидных связей в β-ксиланах.

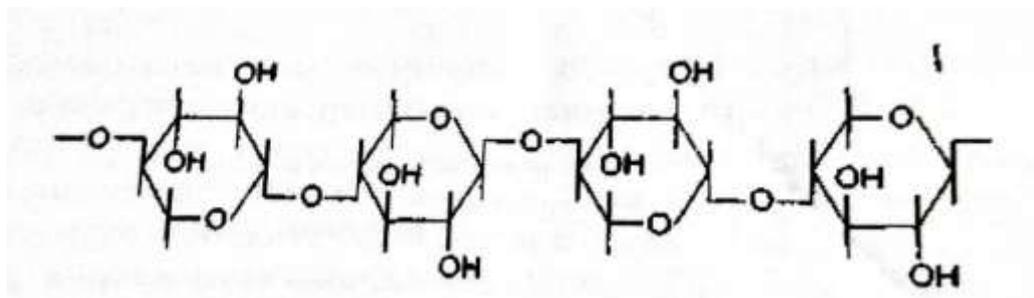


Рис. 4. Молекулярное строение ксилана

Согласно перечню ферментов, приведенному в Номенклатуре, к этой группе можно отнести несколько ферментов.

1,4-β-D-ксиланксиланогидролаза (КФ 3.2.1.8). Рабочее название фермента эндо-1,4-ксиланаза. Он катализирует реакцию гидролитического расщепления 1,4-β-ксилозидных связей в ксиланах;

1,3-β-D-ксиланксиланогидролаза (КФ 3.2.1.37). Иначе этот фермент называется ксиланазой, эндо-1,3-β-ксиланазой. Фермент беспорядочно гидролитически расщепляет внутримолекулярные связи в 1,3-β-D-ксиланах;

1,4-β-D-ксиланксиланогидролаза (КФ 3.2.1.37). Фермент имеет рабочее название экзо-1,4-β-ксилозидаза, а так же названия ксилобиаза и β-ксилозидаза. Он гидролизует 1,4-β-D-ксиланы путем последовательного

отщепления с нередуцирующего конца молекулы полисахарида остатка D-ксилозы. Этот фермент также гидролизует ксилобиозу до D-ксилозы;

α -L-арабинофуранозидарабинофураногидролаза (КФ 3.2.1.55). Рабочее название фермента экзо-1,3- β -ксилазидаза. Фермент последовательно отщепляет с нередуцирующего конца молекул 1,3- β -D-ксиланов остатки ксилозы.

У большинства микроорганизмов - продуцентов ксиланаз найдено два типа ферментов, гидролизующих основную цепь ксиланов: это эндо-1,4- β -ксилозидазы. Молекулярная масса эндо-1,4- β -ксилазаз лежит в пределах от 16000 до 50000. Молекулярная масса экзо-1,4- β -ксилодаз варьируются достаточно сильно в зависимости от вида продуцента, примерно от 30000 до 100000, но она, как правило, несколько выше, чем у эндо-1,4- β -ксилазаз. Чаще всего оптимум действия ксиланаз наблюдается при pH от 4 до 7 и при температуре от 30 до 50 C. В составе ксиланаз найдено большое количество кислых и ароматических аминокислотных остатков. В большинстве своем эти ферменты - гликопротеиды.

При изучении ксиланаз на различных субстратах было установлено, что по механизму воздействия на арабиноксиланы, арабиноглюкуроноксиланы и ксилоолигосахариды их можно подразделить на две группы: ферменты, гидролизующие α -1,3-связь, расположенную между ксилозой и арабинозой; ферменты, не отщепляющие арабинозу от арабиноксиланов, арабиноглюкуроноксиланов и олигосахаридов.

Установлено, что для многих ксиланаз ветви, содержащие арабинозу и глюкуровую кислоту, являются стерическим - препятствием для образования фермент-субстратного комплекса ксилан - ксиланазы. Образующиеся при ферментативном гидролизе ксиланов ксилоолигосахариды (ксилобиоза и ксилотриоза) часто являются препятствием для дальнейшего гидролиза субстрата до ксилозы. Эти полупродукты гидролиза полисахарида выступают в качестве факторов, тормозящих процесс дальнейшего гидролиза.

Ингибирующее действие ксилоолигосахаридов устраняется в присутствии – экзо-1,4- β -ксилозидазы, что связано с гидролизом ксилоолигосахаридов до ксилозы, т.е. проявляется суммарный эффект воздействия двух ферментов на субстрат.

В литературе нет единого мнения о способности экзо-1,4- β -ксилозидаз самостоятельно гидролизовать ксиланы. Большинство исследователей считают, что экзо-1,4- β -ксилозидаза - это типичная β -глюкозидаза, гидролизующая короткие цепи ксилоолигосахаридов и β -ксилозидов. Данные, которые свидетельствуют о гидролизе ксиланов под действием экзо-1,4- β -ксилозидазы, вероятнее всего, являются результатом наличия в

этих препаратах примесей эндоксилаза. Экзо-1,4- β -ксилозидазы гидролизуют ксилозиды и ксилоолигосахариды с нередуцирующего конца молекулы. При этом скорость гидролиза возрастает с уменьшением степени полимеризации олигосахаридов; продуктом гидролиза является β -ксилоза.

β -Глюкозидазы. В Номенклатуре ферментов β -глюкозидазы представлены в группе КФ 3.2.1.21 « β -D-Глюкозидглюкогидролаза». В литературе эти ферменты известны под названиями: генциобиаза, амигдалаза и самое распространенное - целлобиаза. β -Глюкозидаза - это фермент экзогенного действия. Она гидролитически расщепляет последнюю с нередуцирующего конца β -1,4-связь в β -D-глюкозидах, высвобождая β -D-глюкозу. β -Глюкозидаза проявляет широкую субстратную специфичность. Некоторые ферменты этой группы гидролизуют - не только β -D-глюкозиды, но и β -D-галактозиды, α -1-арабинозиды или β -D-ксилозиды.

Гидролиз белков и пептидов происходит под действием протеолитических ферментов.

Различают простые белки, состоящие только из аминокислот, их называют протеинами, и сложные белки, в состав которых наряду с белковой частью молекулы входят соединения небелковой природы (углеводы, витамины, жиры и др.), - протеиды. Все эти соединения имеют большую молекулярную массу и сложны по строению.

Пептиды имеют более низкую молекулярную массу, чем белки, и по составу подобны простым белкам. Они могут быть либо продуктами неполного гидролиза белка, либо природными соединениями.

Протеолитические ферменты синтезируются практически всеми живыми существами. Эти ферменты очень широко распространены в природе. Из растений промышленный интерес представляют плоды дынного дерева, побеги и листья инжира и отходы переработки ананасов. Активными продуцентами протеиназ являются бактерии, микроскопические грибы и актиномицеты. При промышленном получении протеиназ чаще всего используют микроорганизмы, относящиеся к родам *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* и некоторые другие.

Протеолитические ферменты делятся на две основные группы: пептидазы КФ 3.4.11-15 и протеиназы - КФ 3.4.21-24. В первой группе протеолитических ферментов - пептидазах - подразделение по подподклассам осуществляется на основе механизма расщепления пептидных связей в пептидах. Группа КФ 3.4.11 - α -аминоацилпептидгидролазы - гидролитически расщепляют первую с N-конца пептидную связь. Группа КФ 3.4.12-гидролазы пептидиламинокислот или гидролазы ациламинокислот — объединяет ферменты, действующие на

первую пептидную связь \notin С-конца. Ферменты группы КФ 3.4.13 - дипептидгидролазы - гидролизуют дипептиды; групп КФ

3.4.14 - дипептидилпептидгидролазы - и КФ 3.4.15 - пептидилдипептидгидролазы - гидролизуют дипептиды соответственно с N- и С-конца.

Вторая группа протеолитических ферментов - протеиназы - имеет четыре подподкласса, в которых все ферменты подразделяются в зависимости от особенностей механизма катализа, установленного по функционированию активного центра фермента, а также влияния рН на его активность.

Специфичность К субстрату рассматривается лишь с позиции идентификации индивидуальных ферментов в пределах каждой из групп.

Сериновые протеиназы - протеиназы, для которых характерно наличие в каталитическом центре триады аминокислот: аспарагиновой кислоты, гистидина и серина. В этот подподкласс внесены некоторые микробные протеиназы.

Тиоловые протеиназы - протеиназы, имеющие в активном центре SH-группу цистеина. В подподкласс 3.4.22 вошел ряд важных протеиназ растительного происхождения, таких как папаин, фицин, бромелаин, химопапаин, и некоторые микробные протеиназы.

Кислые протеиназы - имеют оптимальный рН ниже 5, в каталитическом акте у этих ферментов участвуют остатки дикарбоновых аминокислот. Наиболее широко известны из этого подподкласса пепсин, катепсин и ряд кислых протеиназ грибного происхождения.

Металлосодержащие протеиназы - протеиназы, содержащие ионы металлов. В основном это различные микробные нейтральные протеиназы.

Основные протеиназы растительного происхождения: папаин, фицин, бромелаин, химопапаин. Папаин не обладает субъединичной структурой и по форме близок к глобулярным белкам. Пептидная цепь уложена так, что гидрофобные остатки аминокислот погружены внутрь глобулы, а гидрофильные расположены на поверхности. Характерной чертой структуры является наличие расщелины (щель, углубление, карман), идущей от поверхности в глубь молекулы, по стенкам которой группируются гидрофобные группы. Активный центр фермента располагается внутри этой расщелины, куда проникает субстрат и где происходит реакция. Внутри щели можно выделить ряд остатков, которые играют важную роль в осуществлении катализа. В активном центре папаина имеются цистеин и гистидин, имидазол и аспарагин, что отдаленно напоминает активный центр сериновых ферментов. Считают, что существенную роль для

проведения каталитического акта имеет гидрофобное окружение, в котором оказываются реагирующие вещества. Наиболее реакционноспособен в этом кармане у папаина, фициана и бромелиана остаток цистеина. В качестве ковалентного интермедианта образуется остаток цистеина.

В полипептидной цепи папаина содержится 212 аминокислотных остатков, имеется три -S-S-группы; молекулярная масса папаина 20 700, он имеет α -структуру и глобулярное строение. Папаин обладает широкой специфичностью. Он осуществляет глубокий протеолиз белков и синтетических субстратов.

Гидролиз липидов происходит под действием липолитических ферментов. Липазы содержатся в заметных количествах в семенах многих растений: ржи, пшеницы, овса, сои, хлопчатника и особенно клещевины. Липазы образуют очень многие микроорганизмы. Бактерии, как правило, накапливают внутриклеточную липазу, а актиномицеты, грибы и дрожжи - преимущественно внеклеточную. Среди бактерий найдены активные продуценты липаз, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*. Среди дрожжей лучшими продуцентами являются представители рода *Candida* (*C. lipolytica*, *C. parailipolytica*, *C. cylindraceae*). Для промышленного использования чаще всего рекомендуются микроскопические грибы. Высокая липазная активность отмечается у грибов родов: *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Oospora* и *Humicola*. Продуценты липаз найдены и среди актиномицетов (виды *Streptomyces flavogriseus*, *Thermoactinomyces vulgaris* и ряд других).

Липиды - это сложная смесь органических веществ, которая подразделяется на две большие группы: сложные и простые липиды. К простым липидам относятся липиды, не содержащие азота, фосфора и серы. Это воски, диольные липиды, ацилглицерины (глицериды), алкильные липиды, нейтральные плазмалогены, гликолипиды. Сложные липиды - сульфолипиды, инозитол, глицерофосфолипиды, фосфорсодержащие плазмалогены, сфинголипиды, состоящие из сфингомиелинов и гликосфингомиелинов. Среди простых липидов наиболее широко распространены простые нейтральные липиды, которые часто составляют до 95-97 % общей массы липидов и, по существу, являются жирами. В состав жиров в основном входят триглицериды, но присутствуют также ди- и моноглицериды. Природные жиры содержат смешанные триглицериды, в состав которых входят различные остатки карбоновых кислот. В формировании триглицеридов может участвовать до 400 остатков кислот различного строения. Поэтому состав жира неоднороден и очень сложен.

По Номенклатуре ферментов липаза имеет название триацилглицеролацилгидролаза (КФ 3.1.1.3), ее рекомендуемое рабочее название триацилглицероллипаза. Этот фермент имеет еще несколько названий: стеапсин, трибутираза, липаза триглицеридов, липаза.

Липаза производит тидролитическое расщепление триацилглицерола¹⁰ диацилглицерола и остатка отщепляемой жирной кислоты. Затем идет отщепление следующих остатков жирных кислот до образования глицерина. При этом скорость отщепления кислотного остатка от триацилглицерола в несколько раз больше, чем от ди- и тем более от моноацилглицерола. Фермент проявляет наибольшее сродство к эфирной связи, расположенной на внешней части молекулы триацилглицерола. Липазы быстрее отщепляют остатки высокомолекулярных жирных кислот, чем низшие карбоновые кислоты, т.е. нерастворимые в воде субстраты. Ферментативный гидролиз липидов имеет существенное отличие от других ферментативных реакций. Это гетерогенный процесс, так как подавляющее большинство липаз растворимо в воде, а субстратные молекулы - нерастворимы и объединены в малоподвижные крупные ассоциаты (мицеллы, эмульгированные жировые капли). Чем выше степень диспергирования субстрата, тем быстрее идет липолиз. Это связано с явлением сорбции фермента на поверхности субстрата. Этот процесс и является первым актом ферментативного липолиза. Чтобы адсорбция фермента была продуктивной, необходимо внедрение фермента в поверхностный слой субстратной молекулы, и только после этого у фермента появляется возможность контакта активного центра с молекулой субстрата. Активный центр липаз можно расчленить на три участка, различающихся между собой функционально: 1) контактный, ответственный за узнавание поверхности субстратной фазы (мицеллы, эмульсии, монослоя и др.); 2) гидрофобный связывающий участок, осуществляющий извлечение одной молекулы субстрата из субстратной фазы в глобулу фермента; 3) участок, образованный группами, осуществляющими каталитический акт гидролиза сложноэфирной связи. Такое расчленение групп активного центра позволяет объяснить процесс катализа, осуществляемый липазами. Не исключено, что аналогичные участки имеются и у других ферментов, так как известны факты регуляции каталитической активности ферментов путем изменения физического состояния субстрата.

Липаза является гетерогенным белком, имеющим небелковый компонент липидной природы, который при удалении липидного фрагмента может потерять активность. Липидный фрагмент необходим для того, чтобы фермент мог функционировать в гетерогенной среде. Этот фрагмент

ответствен за формирование участка узнавания субстрата. Участок узнавания может конструироваться у некоторых липаз путем объединения белковой части фермента с небелковыми фрагментами или полипептидами. Специфичность же липолитических ферментов к физическому состоянию субстрата в ряде случаев связана с их надмолекулярной структурой. Липазы, полученные из различных источников, заметно отличаются друг от друга. Для многих липолитических ферментов определена субъединичная структура. Фермент имеет множественные формы, которые по своим свойствам далеко не идентичны. Ряд липаз при липолизе природных масел и жиров различного происхождения не проявляет строгой специфичности и гидролизует их с одинаковой скоростью. Так, при проведении липолиза оливкового, подсолнечного, кунжутного, хлопкового и соево-бобового масел и масла семян рапса с помощью липазы из гриба рода *Rhizopus* степень активности и глубина гидролиза были почти на одном уровне. Липолитические ферменты, выделенные из различных источников, различаются по своей термостабильности. Известны липазы, стабильные при 20 и 65 °С, но большинство наибольшую стабильность имеет в диапазоне температур от 30 до 40°С. Ряд липаз повышает активность при низких температурах - это явление необычное, но объяснимое, так как реакции могут протекать с большей скоростью благодаря различным фазовым переходам в твердое состояние участвующих в реакции компонентов. Стабильность фермента и некоторые его свойства во многом зависят от степени очистки. Так, для большинства липаз чем они чище, тем ниже их стабильность. Поэтому для каждого ферментного препарата определяются оптимальные температура, рН, стабильность и другие его свойства. В зависимости от оптимального рН для действия липаз они делятся на кислые (4-6), нейтральные (6,5-7,2) и щелочные (7,5-9). Большой промышленный интерес вызывают микроорганизмы, продуцирующие термостабильные липазы, особенно представители родов *Geotrichum*, *Aspergillus* и *Mucor*.

4.3.2. Негидролитические реакции

Негидролитические ферменты используются на разных технологических стадиях производства пищевых продуктов, причем на стадиях первичного преобразования исходных субстратов используются трансферазы и лиазы, а на заключительных - оксиредуктазы и изомеразы.

Окислительно-восстановительные реакции

Каталаза (КФ 1.11.1.6) - геминовый фермент, содержащий тетрапиррольное кольцо и катализирующий расщепление перекиси водорода на воду и кислород, а также окисление спиртов в альдегиды, сопряженное с окислением перекиси водорода. Фермент имеет молекулярную массу 240-300 кДа, состоит из одной субъединицы, может существовать в виде тетрамера и гексамера. Каталаза *P. vitale* имеет широкий рН-оптимум - от 4 до 9, стабильна при температуре до 65 °С.

Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) катализирует окисление глюкозы в глюконовую кислоту. Промышленные препараты глюкозооксидазы выделяют из культур микроскопических грибов. Активные продуценты внеклеточной глюкозооксидазы - грибы *Penicillium* и *Talaromyces*, наиболее перспективны виды *P. vitale*, *P. amagasakiense* и *P. funiculosium*. Фермент из *P. vitale* имеет молекулярную массу 150 кДа, оптимальный рН 5,6-5,8, стабилен при рН 3-7 и температуре 10-50 °С. Ингибиторы — ионы ртути и меди, стабилизаторы - ионы кальция и аммония. В пищевой промышленности глюкозооксидазу используют совместно с каталазой, потому что необходимо разлагать перекись водорода, образующуюся на первой стадии окисления глюкозы глюкозооксидазой. Грибы пенициллы и аспергиллы обладают способностью продуцировать значительные количества обоих ферментов. Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) катализирует окисление органических соединений с помощью перекиси водорода, перенося водород от молекулы субстрата к перекиси. Субстратами фермента служат фенолы (пирокатехин, пирогаллол, гидрохинон, резорцин, гваякол), ароматические кислоты (бензойная, салициловая, галловая), аскорбиновая кислота, анилин, толуидин, нитриты и другие соединения. Фенол обладает не только пероксидазными, но и оксидазными свойствами, то есть окисляет органические соединения за счет неактивированного молекулярного кислорода. Большинство субстратов пероксидазы - фенолы. Под действием фермента они окисляются до хинонов, которые сами по себе являются сильными окислителями. Хиноны склонны к полимеризации с образованием темноокрашенных соединений.

Пероксидаза присутствует в каждой растительной клетке и представлена в растениях набором изоферментов, число которых у одного вида может составлять от 3 до 42. Наличие изоферментов расширяет границы функционирования пероксидазы, она проявляет активность в зоне рН 3-14. При изменении внешних условий и гомеостаза растения изменяется изоферментный состав пероксидазы, что является приспособительным инструментом.

Пероксидаза - двухкомпонентный фермент, состоящий из белка гликопротеина и геминового компонента, который включает протопорфирин IX и ион трехвалентного железа. Геминный компонент выполняет роль активного центра. Фермент из различных источников имеет молекулярную массу от 22 до 44 кДа, белковая часть на 43 % спирализована.

Пероксидаза активируется ионами марганца, цинка, меди, кальция и ингибируется цианидами и хелатами.

о-Дифенолоксидаза (КФ 1.14.18.1) - медьсодержащий фермент, присутствующий во всех органах и тканях растения и катализирующий окисление дифенолов, полифенолов, монофенолов и дубильных веществ с помощью кислорода воздуха. Под действием дифенолоксидазы окисляются в хиноны, которые, конденсируясь, превращаются в меланины. Конденсация хинонов протекает по свободнорадикальному механизму. Цвет меланинов зависит от их молекулярной массы. Чем крупнее молекула, тем темнее окраска, по мере увеличения молекулярной массы цвет меняется от розового до черного. Окисление фенолов под действием дифенолоксидазы и тирозиназы (тирозин-3-монооксигеназы) лежит в основе потемнения овощей и фруктов при чистке, измельчении, сушке. Потемнение чайного листа в процессе ферментации также связано с окислением дубильных веществ в присутствии дифенолоксидазы и кислорода воздуха. Оптимум pH 5-7. Ингибиторами фермента являются синильная кислота, азид натрия, сероводород, окись углерода, диэтилдитиокарбамат и хелаты.

Липоксигеназа (КФ 1.13.11.12) - железосодержащий фермент, который за счет молекулярного кислорода катализирует окисление полиненасыщенных - жирных кислот, содержащих - цис-цис-1,4-пентадиеновую группу (линолевой, линоленовой, арахидоновой), и их эфиров. Ненасыщенные жирные кислоты превращаются в гидрооксикислоты, при этом изменяется положение двойной связи. У покоящихся семян бобовых, льна, в зародышах злаков активность фермента высокая, а в семенах подсолнечника, рапса, конопли, ореха - невелика, но возрастает при прорастании семян. Молекулярная масса растительных липоксигеназ 67-108 кДа, оптимум pH 6,2- 7,5, температура 20-40 °C. Изоформа соевой липоксигеназы активируется ионами кальция.

Фермент ингибируется антиоксидантами: токоферолами, каротиноидами, янтарной и фумаровой кислотами, флавоноидами (морин, кемпферол, мирицетин, кверцетин, дигидрокверцетин и др.), аскорбиновой кислотой.

Антиоксидантные свойства янтарной кислоты связывают с ее хорошей окисляемостью, что предотвращает перекисное окисление липидов

(окислительная способность гидропериксесей реализуется в окислении янтарной кислоты, а не следующих порций липидов).

Фумаровая кислота, имеющая двойную связь, может участвовать в образовании фермент-субстратного комплекса с липоксигеназой (вместо истинного субстрата - линолевой кислоты) и является типичным конкурентным ингибитором липоксигеназы.

Характер действия токоферола зависит от его концентрации в реакционной среде. При концентрации ниже 5 мкмоль реализуется в основном механизм взаимодействия α -токоферол и липоксигеназы, что приводит к необратимому ингибированию фермента. При более высокой концентрации α -токоферол образует ассоциаты, структурно не способные взаимодействовать с липоксигеназой, но в них наиболее эффективно реализуется способность α -токоферола нейтрализовывать высокоэнергетические и радикальные частицы, то есть его стабилизирующее действие. Оно наиболее выражено при концентрации α -токоферола 10-25 мкмоль, когда фермент наилучшим образом защищен от деструкции и ингибирования продуктами окисления и потому наиболее активен. При концентрации выше 25 мкмоль токоферол существует в высокоагрегированном состоянии, затрудняющем проявление им биологических свойств.

Из числа изомеров токоферолов наибольшей антиоксидантной способностью обладают γ - и δ -токоферолы, но в качестве пищевой антиоксидантной добавки используют α -форму с наиболее высокой витаминной активностью. Антиоксидантные свойства токоферола повышаются в присутствии аскорбиновой кислоты и ее жирорастворимой формы - аскорбилпальмитата. Для стабилизации растительных масел рекомендуют концентрацию α -токоферола 50-80 мг/100 г продукта.

Флавоноиды используют как индивидуальные соединения (сильный антиоксидант - кверцетин), а также в составе растительных экстрактов, где присутствуют также токоферолы, каротиноиды и аскорбиновая кислота.

Лакказа (КФ 1.14.18.1) - медьсодержащий фермент, обладающий широкой специфичностью в отношении фенольных субстратов и катализирующий образование феноксильных радикалов. Грибы могут синтезировать несколько изоформ лакказы, отличающихся по специфичности действия.

Лакказы грибов рода *Coriolus* имеют молекулярную массу 60-69 кДа, оптимум действия при pH 4,4-5 и температурс 50-55 °С. Фермент из *C. versicolor* содержит 4 атома меди на молекулу. Содержание углеводного компонента В лакказе *C. zonatus* из составляет около 10 %.

Лигниназа-гемсодержащая Mn-независимая пероксидаза. Этот фермент катализирует окислительную деполимеризацию лигнина с участием перекиси водорода. Молекулярная масса фермента 40-63 кДа, оптимум действия при pH 2,7-3,4 и температуре 28-34 °С. Лигниназа катализирует расщепление

C-C-связей в димерных моделях лигнина, окисление бензиловых спиртов и метильных заместителей в бензильных соединениях, гидроксирование бензильных метильных групп и олефиновых связей, декарбоксилирование фенилуксусной кислоты, расщепление эфирных связей, раскрытие ароматического кольца, полимеризацию фенолов.

Грибы синтезируют до 15 гемсодержащих - пероксидаз, в т.ч. несколько Mn- независимых.

Mn-зависимые пероксидазы, участвующие в деструкции лигнина, имеют молекулярную массу 42-49 кДа, активны в кислой среде и могут окислять субстраты и в отсутствие марганца; при этом скорость реакции зависит от природы субстрата.

Реакции переноса. К реакциям переноса относят реакцию образования циклодекстринов из крахмала, катализируемую ферментом циклодекстринглюканотрансферазой (КФ 2.4.1.19), относящемуся к классу трансфераз. Образование циклодекстринов приводит к деполимеризации крахмала, причем отделение фрагмента α -1,4-глюкана и замыкание его концов в циклодекстрин происходит со стороны нередуцирующего конца линейного участка субстрата.

Циклодекстринглюканотрансфераза предпочтительно катализирует образование циклодекстринов из высокомолекулярных субстратов, степень полимеризации 30-100 глюкозных единиц. Наибольший выход получают из кукурузного и картофельного крахмала. В присутствии амилолитических ферментов, прежде всего α -амилазы, быстро понижающей среднюю молекулярную массу декстринов, степень конверсии крахмала в циклодекстрины снижается. Из глюкозы циклодекстрины не образуются.

Помимо крахмала и амилодекстринов, циклодекстринглюканотрансфераза использует в качестве субстратов образовавшиеся циклодекстрины, катализируя их взаимные превращения, а также образование глюкозы, мальтозы и мальтотриозы. С этим связано изменение соотношения форм циклодекстринов в ходе реакции. Наиболее лабильны γ -циклодекстрины.

Циклодекстринглюканотрансфераза катализирует перенос остатков глюкозы и мальтоолигосахаридов на акцепторы. такие как сорбоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, мальтоолигосахариды, ксилоза, галактоза, глюкуроновая

кислота, инозит. Образуются линейные олигосахариды, в структуре которых акцептор расположен на редуцирующем конце. Так, при переносе остатка глюкозы на сорбозу или сахарозу образуются соответственно глюкозилсорбоза и мальтозилфруктоза. Введение акцепторов в среду с крахмалом ускоряет его деградацию.

Циклодекстринглюканотрансферазу синтезируют в качестве внеклеточного фермента различные виды бактерий, микрококков, актиномицетов, микроскопических грибов.

Соотношение α -, β - и γ -циклодекстринов в продуктах реакции зависит от источника фермента и может различаться у штаммов одного вида. Для циклодекстринглюканотрансфераз *V. macerans*, *V. licheniformis*, *Micrococcus varians* и *Klebsiella pneumoniae* характерно преобладание α -циклодекстринов, *V. circulans*, *V. megaterium*, *M. luteus* - β -циклодекстринов, *V. subtilis* - γ -циклодекстринов. На соотношение форм циклодекстринов влияют видовые особенности крахмалов.

4.3.3. Определение влажности зерна и продуктов его переработки

При оценке качества зерна и продуктов его переработки особое значение имеет соотношение между содержанием в нем сухих веществ и влаги. От содержания влаги в зерне и продуктах его переработки, прежде всего, зависит стойкость их при хранении. Влажное зерно и продукты его переработки легко подвергаются самосогреванию, что ухудшает их качество, и, если не применять необходимых мер, могут полностью испортиться.

Влага способствует жизнедеятельности микроорганизмов, вредителей зерна и продуктов его переработки. От содержания влаги в зерне зависят технологические режимы его переработки.

В зависимости от содержания влаги различают четыре состояния (табл.7) зерна по влажности: зерно сухое, средней сухости, влажное и сырое.

Таблица 7 – Влажность зерна, %

Культура	Состояние зерна по влажности					
	Сухое до (вкл)	Средне сухости		Влажное		Сырое свыше
		с выше	до (вкл)	с выше	до (вкл)	
Пшеница	14	14	15,5	15,5	17	17
Рожь	14	14	15,5	15,5	17	17
Ячмень	14	14	15,5	15,5	17	17

Гречиха	14	14	15,5	15,5	17	17
Овес	14	14	15,5	15,5	17	17
Просо	13,5	13,5	15,0	15,0	17	17
Рис	14	14	15,5	15,5	17	17
Кукуруза	14	14	15,5	15,5	17	17
Чечевица	14	14	17	17	19	19
Горох	14	14	16	16	20	20
Фасоль	16	16	18	18	20	20
Семя:						
Подсолнечное	7	7	8	8	9	9
Конопляное	11	11	12	12	14	14
Клещевинное	6	3	7	7	9	9

Определение влажности зерна и продуктов его переработки основным стандартным методом высушивания навесок в сушильном шкафу СЭШ-3М при температуре 130°C в течение 40 мин. Влажность зерна и продуктов его переработки определяют в следующем порядке.

1. Включатель шкафа ставят в положение "Включено". При этом красным светом загорается сигнальная лампа.

2. Отбирают необходимое количество бюкс диаметром 48 мм и высотой 20 мм. Бюксы должны быть заранее подготовлены: тщательно очищены, с номером на крышке и на самой бюксе. Бюксы взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г.

3. Размолоть около 20 г зерна и полученный продукт (шрот) немедленно поместить в банку с притертой пробкой. Крупность размола контролируем просеиванием через проволочное сито с размером ячеек 0,8 мм. Проход через это сито должен быть не менее: для пшеницы - 60%, гречихи - 50%, овса - 30%, для прочих зерновых и бобовых культур - 50%.

4. Размолотое зерно смешать и отобрать от него из разных мест две навески немного более 5 г. Навески поместить в металлические, предварительные взвешенные бюксы. Перенести бюксы с пробами на весы и отвесить две навески по 5 г.

5. Снять крышки с бюксов и вместе с крышками поместить бюкс в подогретый сушильный шкаф. Навески высушивать в шкафу в течение 40 мин, считая с момента прекращения загрузки шкафа.

6. Через 40 минут вынуть бюксы с навесками из шкафа тигельными щипцами, закрыть крышками и перенести в эксикатор на 15 -20 минут до полного охлаждения.

7. Взвесить бюксы с точностью до 0,01 г.

8. Определить количество потерянной влаги по разности между массой навесок до высушивания и после высушивания.

9. Выразить значение влажности в процентах. Для этого массу испарившейся влаги следует умножить на 20. Из двух параллельных определений вывести среднее арифметическое с точностью до 0,1 %.

Определение влажности зерна и продуктов его переработки экспресс- методом. Wile – 55 представляет собой микропроцессорный электронный прибор, который обеспечивает непосредственный вывод на дисплей процентного содержания влаги в 16 различных типах зерна и семян. Измеряемый диапазон содержания влаги от 8% до 35% и от 6% до 25% для масличных культур.

Ход работы.

1. Наполнить измерительный цилиндр зерном сначала на одну четверть. Слегка встряхнуть влагомер так, чтобы зерно распределилось вокруг центрального сенсора. Затем продолжить наполнение, пока зерно не заполнит цилиндр до краёв.

2. Аккуратно установить крышку измерительного цилиндра на его резьбу и вращать до тех пор, пока центральная (подвижная) часть крышки не установится вровень со всей крышкой.

3. Нажать и отпустить кнопку «Р». После стартового самоконтроля прибора появится номер шкалы, которая использовалась последний раз. Если необходимо перейти на другую шкалу, т.е. определить влажность другого типа зерна, надо нажать на кнопку «F» до тех пор, пока на экране не появится номер требуемой шкалы. После короткой паузы прибор сам переходит в режим измерения и на экране последовательно возникнут буквы английского алфавита g.u.n. После окончания измерения на экране появится измерённое значение влажности.

При проведении измерений необходимо удалять повреждённые и зелёные зёрна из пробы. Если проба зерна берётся непосредственно из сушильного агрегата, надо дождаться, когда зерно остынет т.к., всё это приводит к искажению показания прибора.

4.3.4. Метод выделения α - и β -амилаз и определение их активности

Ход работы.

Выделение α -амилазы

В пробирку вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют на кончике ножа порошок ацетата кальция и пробирку выдерживают в течение 15 мин. на водяной бане, нагретой до 68 °С (в период нагревания температура воды не должна подниматься выше 70 °С и опускаться ниже 66 °С). Затем содержимое пробирки охлаждают холодной водой. При таком прогревании β -амилаза полностью инактивируется, а α -амилаза сохраняет свою активность. Полученный раствор используют для определения активности α -амилазы.

Выделение β -амилазы

В колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют 4 мл воды, 1 мл раствора с концентрацией соляной кислоты равной 0,1 моль/л (рН полученной смеси должен быть 3,3). Затем колбу с содержимым помещают на 15 мин на снег или лед (можно в морозильную камеру холодильника). В этих условиях α -амилаза полностью инактивируется, а β -амилаза сохраняет свою активность. По истечении 15 мин выдержки на холоде к содержимому колбы добавляют 2 мл раствора с концентрацией гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) 0,15 моль/л для того, чтобы рН довести до 6,0. Полученный раствор используют для определения активности β -амилазы.

Определение активности амилаз солода по массе гидролизованного крахмала

Реактивы. Вода дистиллированная; вытяжка из солода (приготовление см. Л.р № 1); ацетатный буфер рН 5,5 (к 57,4 мл раствора с концентрацией уксусной кислоты 1 моль/л добавляют 50 мл раствора с концентрацией гидроксида натрия 1 моль/л и общий объем доводят водой до 500 мл); раствор с массовой долей крахмала 2 % (суспензируют 2 г растворимого крахмала в 20 мл холодной воды, затем при помешивании добавляют 80 мл кипящей воды и кипятят 1 мин, после охлаждения объем доводят водой до 100 мл и содержимое перемешивают); раствор с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л; раствор с массовой долей йода 0,3 % в растворе с массовой долей йодида калия 3 % (0,3 г йода кристаллического и 3 г йодида калия смешивают с 3-5 мл воды и после растворения йода объем доводят водой до 100 мл). Для проведения опыта берут шесть пробирок, одна из них контрольная. Пробирки заполняют в

соответствии с таблицей 8.

Таблица 8 – Определение активности амилаз солода

№ п.п.	Компоненты, мл	Пробирки					
		1	2	3	4	5	6
1	Вытяжка из солода	-	0,1	0,2	-	-	-
2	α -Амилаза	-	-	-	0,2	0,4	-
3	β -Амилаза	-	-	-	-	-	1,0
4	Вода	1,0	0,9	0,8	0,8	0,6	-
5	Буфер, pH 5,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
6	Крахмал, 2%	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	Разбавление, R	-	10	5	5	2,5	2,4

Содержимое в пробирках перемешивают и ставят в термостат при 37–38 °С на 30 мин. Такая постановка опыта позволяет одновременно определить суммарную активность амилаз в солодовой вытяжке (α - и β -амилаз вместе), активность α -амилазы и активность β -амилазы. По окончании времени инкубации пробирки из термостата вынимают и в каждую немедленно добавляют по 2 мл раствора с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л и по три капли водного раствора йода; содержимое перемешать.

Пробирки с содержимым, окрашенным в желтые тона, убирают. Пробирки с содержимым, окрашенным в синие, фиолетовые или красные тона оставляют для дальнейшей работы (если после добавления раствора йода все пробирки с одним и тем же ферментным препаратом будут окрашены в желтый цвет, то опыт следует повторить, взяв этот ферментный препарат в меньшем количестве).

Берут мерные колбы вместимостью 50 мл, нумеруют их соответственно номерам, оставленных для дальнейшей работы пробирок. В каждую колбу вносят 30-40 мл воды, 0,5 мл раствора с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л, 10 капель водного раствора йода и 0,5 мл смеси из пробирки в

соответствии с номером колбы. Непосредственно перед отбором смеси содержимое пробирки перемешивают. Содержимое колбы доводят до метки водой, перемешивают и колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре против воды.

Активность амилаз выражают в мг расщепленного крахмала на 1 г солода (или другого материала) за 1 мин. Расчет производят следующим образом:

- определяют массу расщепленного крахмала по формуле:

$$m = \frac{E_k - E_0}{E_k} \cdot C,$$

где m – масса расщепленного крахмала за время опыта, мг; E_k – оптическая плотность контрольного раствора; E_0 – оптическая плотность опытного раствора; C – масса внесенного крахмала, мг (3 мл раствора с массовой долей крахмала 2 % содержат 60 мг крахмала).

Полученный результат умножают на разбавление (см. таблицу 9), т. е. приводят к 1 мл исходной ферментной вытяжки и затем делят на время инкубации (30 мин), что позволяет выразить активность амилазы в мг расщепленного крахмала 1 мл ферментной вытяжки за 1 мин.

Зная методику приготовления вытяжки из биологического объекта, можно легко рассчитать активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1 г биологического материала за 1 мин по формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_0) \cdot 60 \cdot V}{E_k \cdot V_1 \cdot m \cdot 30}$$

где A – активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1 г солода (или другого материала) за 1 мин; E_k – оптическая плотность контрольного раствора; E_0 – оптическая плотность опытного раствора; 60 – масса взятого для анализа крахмала, мг (в 3 мл 2 % раствора содержится 60 мг крахмала);

V – общий объем солодовой вытяжки, полученной из солода (100 мл); V_1 – объем ферментного препарата, взятого для инкубирования, мл; 30 – время инкубации, мин; m – масса солода, взятого для приготовления солодовой вытяжки.

При расчете активности β -амилазы в числитель необходимо ввести число 2.4, которое учитывает все разведения солодовой вытяжки, сделанные при выделении β -амилазы.

Результаты исследований записывают и делают выводы об активности амилаз солода.

Определение активности амилаз по Вольгемуту

Реактивы. Вода дистиллированная; водная вытяжка из солода; растворы с массовыми долями: крахмала 1 % (суспендируют 1 г растворимого крахмала в 10 мл холодной воды, затем при помешивании добавляют 90 мл кипящей воды и кипятят 1 мин, охлаждают, доливают водой до 100 мл и перемешивают), серной кислоты 10 % (60,6 мл концентрированной серной кислоты влить

в 0,5 л воды и разбавить в мерной колбе до 1 л) или соляной кислоты 10 % (236 мл концентрированной соляной кислоты влить в 0,5 л воды и разбавить в мерной колбе до 1 л); водный раствор йода.

Метод основан на нахождении максимального разведения жидкости, содержащей амилазу (вытяжка из солода, слюна, молоко, сыворотка крови и др.), при котором в стандартных условиях происходит полное расщепление определенного количества крахмала.

В штатив устанавливают и нумеруют семь пробирок и в каждую вносят по 1 мл воды. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл вытяжки из солода, тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Содержимое тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т. д. Из последней пробирки 1 мл смеси после перемешивания выливают. Таким образом, получается ряд разведений, в котором содержание солодовой вытяжки в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей.

После этого в каждую пробирку вносят по 2 мл раствора с массовой долей крахмала 1 % и содержимое перемешивают встряхиванием. Все пробирки помещают в термостат при 37–38 °С на 30 мин. По окончании инкубации в каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора с массовой долей серной кислоты 10 % (для остановки реакции) и по три капли водного раствора йода. Результат опыта вносят в таблицу 9, обозначая окраску первыми буквами образовавшегося цвета раствора.

Таблица 9 – Окраска проб с йодом после инкубации

Показатель	Номера пробирок и доля вытяжки в содержимом, мл					
	1	2	3	4	5	6
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Окраска раствора						

Отмечают, в каких пробирках произошел полный гидролиз крахмала (желтое окрашивание с йодом) и по последней из них рассчитывают активность амилазы (амилазное число). Допустим, полный гидролиз взятого для опыта крахмала, произошел в пробирках 1, 2, 3 и 4, следовательно, активность амилазы нужно считать по пробирке 4, в которой доля солодовой вытяжки составляет 1/16 мл. Пересчитав объем расщепленного крахмала на 1 мл солодовой вытяжки, получим число 32. Это означает, что 1 мл неразбавленной солодовой вытяжки в таких же условиях может расщепить 32 мл раствора с массовой долей крахмала 1 %, т. е. амилазное число составляет 32.

При определении амилазной активности молока кратность разведения уменьшают в 8–10 раз, время инкубации увеличивают до 60 мин, для исследования применяют раствор с массовой долей крахмала 0,1 %.

4.3.5. Технология производства крахмала в лабораторных условиях

Ход работы.

1. Выделение крахмала из измельченной массы тканей клубней основано на том, что он нерастворим в воде. Благодаря этому крахмальные зерна в первую очередь осаждаются из взвеси измельченной ткани клубней в воде. Схема производства крахмала проста и состоит из следующих этапов: мойка клубней, измельчение, отделение крахмала от мезги, осаждение крахмала отстаиванием, промывка и сушка.

Выделить крахмал в лабораторных условиях из клубней картофеля можно следующим образом. Клубни картофеля измельчить на терках; измельченную массу собрать на частом сите и промыть холодной водой, собирая промывные воды в емкости. На сите остается картофельная мезга, в промывных водах крахмальные зерна; крахмал осаждается на дне сборной емкости. После отстаивания в течение 10 мин сливают мутную воду, добавляют новую порцию чистой воды, крахмал взмучивают и снова отстаивают. Таким образом, крахмал промывают несколько раз, пока он станет чисто белым. Остатки воды удаляют, раскладывают полученный крахмал на фильтровальной бумаге и сушат.

2. Крахмал в зависимости от органолептических показателей и его состава подразделяются на сорта: картофельный – «Экстра», высший, 1-й и 2-й (для технических целей); кукурузный – высший, амилопектиновый; пшеничный – «Экстра», высший, 1-й.

Качество крахмала определяют по органолептическим и физико-химическим показателям согласно ГОСТ 7698. К наиболее распространенным дефектам крахмала, устанавливаемым с помощью органолептического обследования, относят: наличие механических посторонних примесей и загрязнений, увлажнение крахмала, образование в них комков, наличие запаха и вкуса испорченного продукта с признаками брожения, присутствие насекомых-вредителей. Независимо от сорта и вида крахмала не допускаются металломагнитные примеси.

Органолептическая оценка качества крахмала

Цвет крахмала зависит как от качества используемого сырья, так и от технологии его переработки. Длительное соприкосновение крахмала с соковой водой, применение при его производстве воды, не

удовлетворяющей требованиям, предъявляемым к воде, используемой для технологических нужд, плохая очистка картофеля и другие причины способствуют потемнению крахмала.

Блеск крахмала зависит от величины крахмальных зёрен и режима сушки сырого крахмала. Цвет и блеск крахмала определяют визуально.

Запах крахмала определяют либо после согревания небольшого количества крахмала на ладони, либо после смачивания его в стакане с водой температурой 50°C . В последнем случае воду сливают через полминуты и определяют запах.

Определение **хруста** проводят кулинарной пробой клейстера. Для этого навеска массой 12 г размешивают с 40 мл холодной воды. Отдельно нагревают до кипения 160 мл водопроводной воды и в неё вливают приготовленное крахмальное молоко. Кипятят полученный клейстер в течение 1 мин, охлаждают до комнатной температуры и проводят вкусовую пробу. Хруста не должно ощущаться.

Количество крапин на 1 дм^2 поверхности крахмала. Крапины – это тёмные включения, видимые невооружённым глазом на выровненной поверхности крахмала. Наличие их свидетельствуют о загрязнённости крахмала в процессе производства или при перевозках и хранении. Содержание крапин в крахмале является характеристикой его сорта: чем больше крапин, тем ниже сорт крахмала.

Для подсчёта количества крапин на 1 дм^2 поверхности насыпают 100 г крахмала на чистое стекло или на лист белой бумаги и при помощи стекла или гладкой дощечки выравнивают его поверхность. Затем на поверхность накладывают стеклянную пластинку, разделённую алмазом, на клетки площадью в 1 см^2 каждая и считают в клетках количество крапин. Подсчёт ведут без лупы. Отсчёт производят не менее чем в трёх клетках, расположенных в разных местах стекла. Затем крахмал перемешивают, вторично выравнивают и повторяют счёт крапин также в 3-х клетках. Перемешивание крахмала проводят не менее 5 раз, а всего подсчётов делают не менее 15, из которых берут среднее арифметическое значение результата выражают количеством крапин, приходящихся на 1 дм^2 поверхности.

Влажность. В две заранее высушенные и взвешенные бюксы, отвешивают по 5 г крахмала и помещают в сушильный шкаф. Навески высушивают при температуре 130°C в течение 45 мин.

После высушивания бюксы вынимают, тотчас закрывают крышками и переносят в эксикатор для охлаждения, после чего бюксы взвешивают.

По разнице массы бюкса до высушивания и после высушивания

определяют процентное содержание влажности. В соответствии с ГОСТ 7698 на крахмал картофельный и кукурузный, влажность не должна превышать для всех сортов картофельного крахмала 20%, для высшего и первого сортов кукурузного крахмала – 13%.

Зольность. В крахмале преобладают зольные элементы. Наличие их объясняется высокой адсорбционной способностью крахмальных зёрен.

Берём из средней пробы крахмала навеску 5 г в предварительно прокалённый, охлаждённый в эксикаторе и взвешенный тигель и проводят озоление в муфельной печи. Озоление ведут вначале осторожно, на краю печи, во избежание вспучивания массы, затем прокаливание усиливают, продвигая тигель с пробой вглубь муфеля. Продолжительность озоления около 3 ч.

Тигель с золой охлаждают в эксикаторе и взвешивают, вновь ведут прокаливание в течение 20 мин. Если разность в массе между первым и вторым прокаливанием не превышают 0,001 г, озоление считают законченным. В противном случае озоление повторяют.

Количество золы X в % в пересчёте на сухое вещество определяется по формуле:

$$X = T * 100 * 100 / M(100 - B)$$

где T-масса золы, г; M-масса крахмала, г; B-влажность крахмала, %.

Кислотность. Крахмал имеет кислую реакцию, обуславливаемую в основном наличием кислых фосфатов, адсорбируемых на поверхности зёрен крахмала. При хранении крахмала в неблагоприятных условиях кислотность его может возрасти в результате жизнедеятельности микроорганизмов.

Кислотность крахмала выражается в градусах. Под градусами кислотности подразумевается количество миллилитров 0,1 Н раствора щелочи, необходимое для нейтрализации 100 г сухого вещества крахмала.

К навеске крахмала 20 г приливают 100 мл дистиллированной воды, прибавляют 5-8 капель фенолфталеина и титруют раствором NaOH до ярко-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин. Так как крахмал обладает способностью адсорбировать фенолфталеин, то перед концом титрования добавляют ещё 5-6 капель раствора фенолфталеина. Параллельно оттитровывают в таких же условиях 100 мл дистиллированной воды.

Кислотность крахмала А определяют по формуле:

$$A = 5(a - b) * K * 100 / 100 - B$$

где а-количество 0,1Н раствора щёлочи, затраченной на титрование

крахмала, мл; в- количество 0,1N раствора щёлочи, затраченной на титрование 100 мл дистиллированной воды, мл; В- влажность крахмала, %; К - коэффициент нормальности 0,1N раствора щёлочи.

Таблица 10 – Характеристики качества крахмала

Показатель	Крахмалкартофельный, сорта			
	Экстра	Высший	1-й	2-й
Кислотность, не более	6	10	14	20
Количество крапин на 1 дм ² , шт., не более	60	280	700	-
Массовая доля влаги, %, не более	17-20			
Общей золы в пересчёте на сухое вещество, %, не более	0,30	0,35	0,50	1,0

4.3.6. Биоконверсия крахмала

Ход работы.

Выделение крахмала из картофеля

Клубни картофеля помыть, очистить, отобрать 300 г каждого сорта. Натереть картофель на тёрке, залить водой, дать отстояться и профильтровать через марлю. Картофельную гущу разбавить с водой и пропустить через сито. Вода вымывает крупинки крахмала из картофеля. Когда крахмал осядет на дно, воду слить. Осадок крахмальный взвесить.

Однако наибольшее содержание крахмала в зёрнах злаков: пшеницы, ржи, кукурузы, риса – до 80 % крахмала, в клубнях картофеля только до 25 %.

Выделение крахмал из зёрен пшеницы

Взвесить 100 г зерна пшеницы. Поместить навеску в дробильную установку. Из полученного шрота замесить тесто и оставить на несколько минут. Под струёй воды над плотным капроновым ситом отмыть клейковину от крахмала и оболочек пшеницы. Вода становится мутной, крахмал оседает на дно, воду слить. Осадок взвесить.

Выделение крахмала из риса. Провести выделение аналогично с выделением из зерен пшеницы.

Заполнить таблицу 11. Сделать вывод о выходе крахмала из различного сырья.

Таблица 11 – Выход выделенного крахмала

№ п/п	Крахмалсодержащее сырье	Выход крахмала, %
1	Картофель образец №1	
2	Картофель образец №2	
3	Картофель образец №3	
4	Пшеница	
5	Рис	

4.3.6.1. Изучение процесса биоконверсии крахмала

1. Кислотный гидролиз

Реактивы. Вода дистиллированная; растворы с массовыми долями: крахмала 1 %, соляной (или серной) кислоты 10 %, сахарозы 1 %, гидроксида натрия 10 %, сульфата меди 5 %; водный раствор йода (раствор Люголя); слюна разбавленная 1:3.

Раствор Люголя: 0,3 г кристаллического йода и 3 г йодида калия растворяют в 5 мл воды и после полного растворения йода объем доводят до 100 мл водой.

В плоскодонную колбу или химический стакан наливают 50 мл крахмального клейстера, добавляют 5 мл 10%-ного раствора серной кислоты и помещают на кипящую водяную баню. Через каждые 3–5 мин отбирают в пробирку пробы по 2 мл жидкости, охлаждают и проводят качественную реакцию с раствором Люголя. Синяя окраска первых проб указывает на наличие в растворе крахмала. С течением времени окраска изменяется на красно-бурую: в пробе преобладают продукты гидролиза крахмала – декстрины. Через 20–25 мин окрашивание в пробе исчезнет, крахмал гидролизировался до мальтозы и глюкозы.

К очередной пробе 2 мл добавляют 2 мл 10%-ного раствора с гидроксида натрия, при встряхивании по каплям раствор с массовой долей сульфата меди 5 % до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II). Появление желтого окрашивания, переходящего в красное, указывает на наличие восстанавливающих сахаров (глюкозы и фруктозы), которые в щелочной среде восстанавливают гидроксид меди (II) в оксид меди (I), сами при этом окисляются до альдоновых кислот.

2. Ферментативный гидролиз

Хорошо прополоскать ротовую полость, вымыть пробирку проточной водой, набрать в рот 2-3 мл раствора с массовой долей хлорида натрия 1 % и держать 4-5 мин. Полученный таким образом раствор слюны собирают в пробирку и используют как раствор α -амилазы.

Для обнаружения амилазы в слюне и определения её активности из полученного раствора отливают около 1 мл во вторую чистую пробирку и

приливают двойной объем 1 % раствора крахмала и содержимое перемешивают путем плавного одноразового переворачивания пробирки, закрыв её пальцем. Смесь фермента с субстратом инкубируют в термостате при температуре 37–38 °С в течение 10 мин.

По истечении указанного времени наличие фермента и его активность определяют пробой с йодом: в пробирку вносят одну-две капли раствора Люголя (по одной капле на 1 мл содержимого) и встряхивают. По окраске, появившейся в пробирке можно сделать вывод о продуктах реакции и активности фермента.

В таблице 12 приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом. По результатам реакции сделать вывод о глубине гидролиза и активности ферментов.

Таблица 12 – Реакция крахмала и продуктов гидролиза крахмала на реактив Люголя

Крахмал и продукты его гидролиза	Молекулярная масса продуктов гидролиза	Окраска с раствором Люголя
Крахмал	1 млн. и более	Синяя
Амилодекстрины	10 тыс.	Фиолетовая
Эритродекстрины	От 6 до 4 тыс.	Красно-коричневая
Ахродекстрины	3700	Оранжевая
Мальтодекстрины	1000	Желтая
Мальтоза	342	Желтая

Сравнение кислотного и ферментативного гидролиза крахмала
Реактивы. Вода дистиллированная; растворы с массовыми долями: крахмала 1 %, соляной (или серной) кислоты 10 %; водный раствор йода; раствор амилазы.

В пять пробирок наливают по 3 мл раствора с массовой долей крахмала 1 %. В первую и пятую добавляют по 1 мл воды, во вторую – 1 мл вытяжки из солода, в третью и четвертую – по 1 мл раствора с массовой долей серной или соляной кислоты 10 %. Содержимое перемешивают встряхиванием и первые три пробирки ставят в термостат при 37–38 °С, а четвертую и пятую – в кипящую водяную баню. Через 20 мин пробирки из термостата и водяной бани убирают, горячие охлаждают до комнатной температуры и в каждую добавляют по три капли водного раствора йода. Расщепление крахмала шло в тех пробирках, где содержимое окрашено в желтые, красные и фиолетовые тона. Записывают окраску содержимого каждой пробирки и на основании полученных результатов делают вывод о том, какие из исследованных веществ являются катализаторами и при какой температуре происходит их каталитическое действие. Результаты оформить

в виде таблицы 13.

Таблица 13 – Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

Номер пробы	Субстрат, 2 мл	Катализатор, 1 мл	Температура инкубации, °С	Окраска с йодом
1	Крахмал	Вода	37–38	
2	Крахмал	Амилаза	37–38	
3	Крахмал	Кислота	37–38	
4	Крахмал	Кислота	100	
5	Крахмал	Вода	100	

4.3.7. Ферментативный гидролиз растительного сырья

Краткие теоретические сведения

Известен ряд работ в области использования гидролизатов и ферментололизатов соломы в кормопроизводстве, а также в качестве питательных сред для процессов микробиологического синтеза. Однако в промышленной биотехнологии России ферментативный гидролиз лигноцеллюлозных материалов до сих пор не освоен, хотя применение высокоэффективных ферментных препаратов позволяет осуществлять низкочувствительное производство пригодных к ферментации сахаров из лигноцеллюлозных материалов. Ферментативные процессы протекают при низких температурах (35-70°С) и атмосферном давлении, что обеспечивает экономию капитальных вложений за счет снижения металлоемкости оборудования и низкие энергозатраты на нагрев гидролизуемой массы.

Для максимального выхода редуцирующих веществ при ферментативной обработке лигноцеллюлозного сырья должно быть использовано оптимизированное сочетание ферментов. Активность ферментных препаратов во многом зависит от содержания в субстрате различных фракций (целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина). Для определения наиболее эффективных ферментных препаратов для гидролиза конкретных видов сырья необходимо исследование кинетических закономерностей гидролитических процессов.

Оборудование, приборы, приспособления, материалы

- - весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 50 или 200 г не ниже третьего класса точности;
- - пипетки градуированные по ГОСТ 29227 вместимостью 1, 5 и 10 см³;

- - цилиндр по ГОСТ 1770 вместимостью 20, 50, 100 и 1000 см³;
- - вода для лабораторного анализа не ниже третьей категории качества;
- - вода родниковая и дистиллированная;
- - фильтровальная бумага; вата; растительное сырье (солома);
- - лабораторная установка для ферментативного гидролиза;
- - жидкостный циркуляционный термостат U4;
- - сушильный шкаф ПЭ-4610;
- - вертикальный автоклав-стерилизатор паровой ВК-30-01;
- - лабораторная автоматическая центрифуга с охлаждением Rotina 380R;
- - автоматический анализатор азота Pro-Nitro A фирмы J.P. Seleka;
- - влагомер-анализатор влажности A&DMX-50.

Допускается использование других средств измерений, лабораторного оборудования, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками, не уступающими перечисленным выше.

Ход работы.

Изучить характеристики исследуемого фермента и данные по оптимальным (рекомендуемым) параметрам проведения фермент-лиза.

Перед проведением процесса ферментативного гидролиза проверить работу привода устройства перемешивания, регулятора скорости вращения, возможность измерения падения напряжения на двигателе и возможность измерения тока в цепи питания двигателя.

Проверить рабочее состояние емкостей, бюреток и силиконовых шлангов для подачи кислоты и щелочи. Приготовить 0,1 н раствор серной кислоты и 1 % раствор гидроксида калия и залить их в емкости для подачи кислоты и щелочи. Предварительно вымытый и просушенный лабораторный ферментер с присоединенной технологической обвязкой стерилизовать в автоклаве в течение 1 ч при избыточном давлении 1 атм (0,1 МПа). Массу гидролизуемого материала просушить в сушильном шкафу в течение 1-2 ч при температуре 105°C. На аналитических весах взвесить подготовленную измельченную навеску сырья.

Рассчитанное количество родниковой (или дистиллированной) воды стерилизовать в автоклаве в течение 1 ч при избыточном давлении 1 атм.

Собрать установку, соединить её силиконовыми шлангами с емкостями и бюретками для подачи кислоты и щелочи, подсоединить аппарат к термостату.

Залить дистиллированную воду в предварительно вымытый термостат. (*Примечание:* необходимо поддерживать постоянный уровень воды в термостате в течение всего процесса).

Включить термостат и установить заданную температуру.

После достижения заданной температуры в термостате залить в ферментер расчетное количество воды.

Включить перемешивающее устройство и установить заданную скорость вращения мешалки.

После достижения заданной температуры в ферментере установить с помощью системы управления заданный уровень рН жидкости в аппарате согласно оптимальным параметрам проведения ферментализации, указанным в паспорте исследуемого фермента.

Загрузить в ферментализер гидролизуемый материал.

После установления рабочих параметров процесса ферментализации добавить расчетное количество фермента, записать время начала процесса, физические и энергетические параметры процесса.

Через заданные промежутки времени проводить отбор проб ферментализата и снимать показания физических и энергетических параметров процесса.

Пробы ферментализата после отбора немедленно фильтровать на вакуумном фильтре или на лабораторной автоматической центрифуге с охлаждением течение 15 мин.

Отфильтрованные пробы до анализа хранить в холодильнике при 4-6°C не более, чем 24 ч.

Образцы полученных проб проанализировать следующим образом:

- - на содержание редуцирующих веществ по методу Бертрана;
- - на содержание аминного азота по методу Кьельдаля по ГОСТ 24104-2001 на автоматическом анализаторе азота Pro-Nitro А фирмы J.P. Seleкта;
- - измерить сухой вес на влагомере-анализаторе влажности А&DMX-50;
- - на содержание других продуктов согласно плану эксперимента.

После завершения процесса записать израсходованный объем кислоты и щелочи и конечные значения физических и энергетических параметров процесса.

Произвести слив жидкости из ферментализера.

После слива остаточного количества ферментализата с негидролизованным осадком в ферментализере остается еще значительное

количество последнего. Для полного удаления осадка необходимо операцию мойки повторить 4-5 раз до полного прекращения выхода негидролизированных частиц.

После завершения мойки блок электропривода отключить от сети, поверхность блока привода и другие поверхности, загрязненные брызгами гидролизата, протереть влажной тряпкой.

Построить графики изменения во времени физико-химических и энергетических параметров процесса.

Содержание лабораторной работы

1. Изучение теоретических сведений и рекомендованной литературы.

Ознакомьтесь с теоретическими положениями, представленными в данном учебном пособии, а также с рекомендованной литературой. Ознакомьтесь с характеристиками исследуемого фермента и оптимальными параметрами проведения ферментолиза.

2. Подготовка установки к проведению исследований.

Изучите описание устройства и принцип действия установки для ферментативного гидролиза. Включите установку и задайте рабочие параметры процесса ферментолиза согласно порядку работы.

3. Проведение эксперимента.

Получите ферментолизат, определите физико-химические параметры и рассчитайте энергетические затраты на проведение процесса ферментолиза и удельные энергозатраты на единицу полученных редуцирующих веществ.

4. Обработка результатов эксперимента.

Рассчитайте и запишите полученные результаты анализа серии проб: на содержание РВ, сухого веса, аминного азота. Постройте графики изменения во времени концентраций исследуемых компонентов.

Проанализируйте результаты и запишите вывод по проделанной работе.

Тестовые задания и контрольные вопросы

1. Показатель биологической ценности пищевых белков – это:

1. аминокислотный скор
2. аминокислотный состав
3. наличие всех заменимых аминокислот
4. полноценность белков

2. Укажите белки молока:

1. актин
2. миозин
3. миоглобин
4. коллаген
5. эластин
6. казеин

3. Укажите белки мышечной ткани:

1. актин
2. миозин
3. миоглобин
4. коллаген
5. эластин
6. казеин

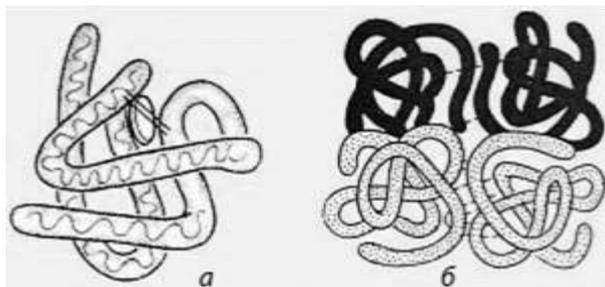
4. Укажите белки соединительной ткани:

1. актин
2. миозин
3. миоглобин
4. коллаген
5. эластин
6. казеин

Установите соответствие между веществом и его массовой долей в организме животных:

1. Вода	А. 10 – 12%
2. Белки	Б. 1,5 – 2,0%
3. Липиды	В. 65%
4. Углеводы	Г. 17%

6. Определить представленные на рисунке структуры белковых молекул:



7. Белок, функцией которого является перенос кислорода из легких в ткани, называется _____

8. Определить по представленному фото биохимическую реакцию и на какие классы органических соединений ее проводят



В результате хранения молока кислотность его увеличилась и составила 30 градусов Тернера и белок молока казеин при кипячении сворачивается (выпадает в осадок). Почему так происходит?

10. К белкам соединительной ткани относятся:

1. эластин
2. коллаген
3. миоглобин
4. актин

Установить соответствие между протеноидами:

1. зеин	А. белок семян ячменя
2. альбумин	Б. белок семян кукурузы
3. гордеин	В. белок шелка
4. фиброин	Г. белок яйца

13. Укажите последовательность этапов превращения билирубина:

1. билирубин
- диглюкуронил билирубина
3. уробилиноген

14. _____ - основной белок молока коров и овец, который используют при производстве сыров и творога

15. Причины отрицательного азотистого баланса:

- овышенное количество белков в составе пищи
- едостаток белка в составе пищи
- едостаток незаменимых аминокислот в белке
- тсутствие незаменимых аминокислот в белке
- атогенная микрофлора кишечника
- арушения процессов переваривания пищи в ЖКТ

16. Лимитирующая аминокислота – это:

1. аминокислота, аминокислотный скор которой наименьший
2. аминокислота, аминокислотный скор которой меньше 100 %
3. аминокислота, аминокислотный скор которой больше 100 %
4. аминокислота, аминокислотный скор которой меньше или равен 100 %

17. Первая лимитирующая аминокислота – это:

1. аминокислота, аминокислотный скор которой наименьший
2. аминокислота, аминокислотный скор которой меньше 100 %
3. аминокислота, аминокислотный скор которой больше 100 %
4. аминокислота, аминокислотный скор которой меньше или равен 100 %

18. Незаменимые аминокислоты:

- истидин
- рнитин
- изин
- ейцин
- етионин
- ерин

Аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека и

животных из других веществ и должны поступать с пищей, называют

Что способствует снижению электронной плотности хирального атома углерода аминокислоты?

21. Три аминокислоты последовательно соединяясь друг с другом сколько образуют пептидных связей между собой?

22. Какие качественные биохимические методы исследования аминокислот бывают:

ветные реакции

реакции осаждения

реакции дегидратации

реакции присоединения

23. Установить соответствие между аминокислотой и группой, к которой она принадлежит:

Аминокислота	Группы
1. цитруллин	А. моноаминомонокарбоновые
2. цистин	Б. диаминомонокарбоновые
3. треонин	В. моноаминодикарбоновые
4. глутаминовая кислота	Г. диаминодикарбоновые

24. По соотношению каких аминокислот судят о наличии полноценных и неполноценных белков в мясе?

1. триптофан

2. метионин

3. тирозин

4. оксипролин

25. Значение сбалансированности аминокислотного состава белков пищи можно в упрощенном виде представить:

1. на классическом примере бочки Либиха

2. в виде уравнения Бегера-Ламберта-Бера

3. схематически указав зависимость аминокислотных скоров

26. Для _____ кислоты характерно хранение и передача генетической информации в организме.

27. Нуклеиновая кислота, которая переносит информацию о строении белков из ядра в цитоплазм _____.

28. Установите последовательность в биосинтезе белка:

интез иРНК на ДНК

рисуединение аминокислоты к тРНК

оставка аминокислоты к рибосоме и образование пептидной связи между АК

оединение иРНК с двумя субъединицами рибосомы

29. Установить соответствие между азотистым балансом и физиологическим состоянием организма животного

Азотистый баланс	Физиологическое состояние
оложительный	А. Взрослое животное, полноценная диета
трицательный	Б. Патологическое состояние, беременность; старение;
зотистое равновесие	В. Растущий организм, высокопродуктивное животное

30. Углеводом, принадлежащим к группе гомополисахаридов, является

крахмал

сахароза

гиалурионовая кислота

мальтоза

Гетерополисахаридом является:

1. гликоген;

2. целлюлоза;

3. гепарин;

4. амилопектин.

32. Дисахаридом является:

1. фруктоза

2. лактоза

3. целлюлоза

4. глюкопираноза

33. Укажите последовательность продуктов реакции пентозофосфатного пути окисления глюкозы:

люкоза 6 –фосфат
-Фосфоглюконат
ибозо-5-фосфат
уклеотиды, ДНК, РНК, коферменты

34. Укажите последовательность образования продуктов реакций первого этапа гликолиза:

руктоза 6 фосфат
люкоза 6-фосфат
руктоза 1,6 – дифосфат
-фосфоглицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон

35. Укажите последовательность образования продуктов реакций второго этапа гликолиза:

-фосфоглицериновый альдегид (глицеральдегид-3-фосфат)
ируват
-фосфоглицериновая кислота (3-фосфоглицерат)
2-фосфоглицерат → фосфоенолпируват

36. Укажите последовательность образования основные продуктов метаболизма углеводов:

полисахариды ► моносахарилы
цетил Ко А
ируват
O₂ и H₂O

37. Резервным полисахаридом в растениях является крахмал, а в животных клетках _____.

38. Укажите последовательность этапов обмена веществ (метаболизм):

ромежуточный обмен (тканевой)
ереваривание (процесс механической и химической обработки пищевых частиц)
оступление макромолекул в организм
бразование и выведение конечных продуктов обмена

39. Основным поставщиком энергии в живом организме являются

40. Биологическая эффективность жира определяется количеством:

енасыщенных жирных кислот

ссенциальных жирных кислот

асыщенных жирных кислот

осфолипидов

ирорастворимых витаминов

теринов

Правильный ответ: 2

41. Воска – это эфиры

1. высших жирных кислот и низкомолекулярных спиртов

2. высших жирных кислот и низкомолекулярных одноатомных спиртов

3. высших жирных кислот и трёхатомных спиртов

4. высших жирных кислот и высших одноатомных спиртов

Правильный ответ: 4.

42. Омега-3- жирной кислотой является:

1. пальмитиновая кислота;

2. олеиновая кислота;

3. линолевая кислота;

4. линоленовая кислота

Правильный ответ: 4.

43. Холестерин является основой для синтеза:

1. витамина А

2. витамина Д

3. витамина С

фосфатидной кислоты

Правильный ответ: 2.

44. Йодное число является показателем:

1. качества природного жира;

2. содержания свободных жирных кислот;

3. содержания в жире насыщенных жирных кислот;

4. содержания в жире ненасыщенных жирных кислот.

45. Какие полиненасыщенные жирные кислоты обладают наибольшей физиологической активностью:

теариновая
иноленовая
леиновая
рахидоновая
инолевая
альмитиновая

46. Укажите последовательность реакций окисления жирных кислот (β – окисление ЖК):

1. Дегидрирование активированной жирной кислоты
2. Дегидрирование окси- жирной кислоты
3. Гидратация β – окси-жирной кислоты
4. Расщепление кето-формы (β -кетоацилтиоэфир-КоА)

47. Укажите последовательность этапов промежуточного обмена жиров:

иосинтез жиров и других классов липидов
кисление ВЖК и глицерина
асщепление триглицеридов в тканях с образованием ВЖК и глицерина
бразование и расщепление кетоновых тел

48. Необходимо вычислить суммарный выход АТФ при полном окислении одной молекулы миристиновой кислоты.

49. Укажите последовательность проведения эмульгирования жиров используя желчь:

1. оставить на 5 минут
2. набрать в пробирку 1 мл желчи
3. встряхнуть пробирку
4. добавить 5 капель подсолнечного масла

50. Укажите последовательность проведения опыта по определению жира в молоке кислотным методом (метод Гербера):

обавление по стенке пробу молока
обавление серной кислоты
стряхнуть пробирку, поместить в водяную баню и центрифугировать

обавление изоамилового спирта

51. Установите последовательность основных этапов переваривания липидов:

- мульгирование
- оступление липидов в ЖКТ
- сасывание
- идролиз

52. Укажите последовательность процесса перикисного окисления липидов:

1. распад пероксида с образованием конечного продукта – малонового диальдегида (МДА)
2. присоединение молекулы кислорода к свободному радикалу –СН-
3. превращение в пероксидный радикал жирной кислоты
4. дегидрирование (отщепление атома Н от –СН₂ группы)

53. Какой жирной кислоте соответствует цифровой символ 18:3 (9,12,15)?

54. Небелковые части ферментов называют:

1. кофермент;
2. апофермент;
3. холофермент;
4. витамин.

55. Основные ферменты, участвующие в переваривании белков:

- ипаза
- минопептидаза
- епсин
- милаза
- астриксин
- рипсин

56. Установите соответствие

	Ферменты	№ ответа	Катализируемая реакция
	протеиназа		гидролизует пептидные связи
	протеинкиназа		расщепляет H ₂ O ₂
	каталаза		фосфорилирует белок
	α-амилаза		гидролизует 1,4-гликозидные связи

		переносит электроны
--	--	---------------------

57. Установите соответствие между классами ферментов

	Класс фермента по классификации	№ ответа	Ферменты
			трансферазы
			лиазы
			оксидоредуктазы
			лигазы
			гидролазы
			изомеразы
			редуктазы
			транслоказы

Установите соответствие между термином и его определением:

1. Ферменты	А. побочный продукт сыроварения. Она содержит все компоненты молока за исключением казеина и большей части молочного жира
2. Сыворотка	Б. специфические вещества, катализирующие биохимические реакции.
3. Субстрат	В. иммунные тела молока, которые растворяют бактериальные клетки и чужеродные тельца, попадающие в кровь.
4. Лизины	Г. вещество, подвергающееся ферментативному воздействию.

59. По химическому строению все ферменты принадлежат к классу_____.

60. В результате лабораторного эксперимента по изучению активности фермента амилазы было установлено, что при добавлении йода к исследуемой пробе крахмала с со слюной окрашивания в фиолетовый цвет не происходит. С чем это связано?

61. Многие ферменты используют в пищевой промышленности. Установите соответствие между ферментом и его использованием:

1. Реннин	А. Применяются при производстве патоки и растворимого крахмала. В хлебопечении они на 30% ускоряют процесс созревания теста, улучшают качество хлеба, предотвращая процесс черствления
2. Амилазы	Б. Обработанное им молоко меньше подвержено окислению и в течение двух недель не утрачивает своего вкуса
3. Трипсин	В. Используют при приготовлении растворимого кофе
4. Целлюлазы	Г. Используется при производстве сыра для коагуляции молока

62. Установить соответствие между ферментом и субстратом:

Фермент	Субстрат
милаза	А. Белок
епсин	Б. Крахмал
ипаза	В. Клетчатка
Целлюлаза	Г. Липиды

63. При недостаточном поступлении витаминов в организм развивается авитаминоз. Это обуславливает необходимость сбалансированной диеты, включающей в себя разнообразные продукты растительного и животного происхождения. Установите соответствие между витамином и содержащими его продуктами:

1. Витамин А	А. Мясные и рыбные продукты, молоко, зерновые культуры
2. Витамин Е	Б. Печень, рыбий жир, сливочное масло
3. Витамин С	В. Растительные и животные масла, пшеница, морковь, яйца, молоко
4. Витамин В ₂	Г. Шиповник, черная смородина, лимон, капуста, картофель

64. Установите соответствие между гормоном и регулируемым им процессом:

1. Инсулин	А. Репродуктивная функция
2. Эстрадиол	Б. Обмен кальция и фосфатов
3. Кальцитриол	В. Водно-солевой обмен
4. Антидиуретический гормон	Г. Обмен углеводов

Контрольные вопросы

1. Классификация белков. Химия простых белков. Природные пептиды.

2. Физико-химические свойства белков. Изоэлектрическая точка растворов белков.
3. Уровни структурной организации белков. Связь структуры белка с биологической функцией.
4. Аминокислоты: их строение и свойства. Классификация аминокислот.
5. Сложные белки и их классификация (примеры).
6. Биологические катализаторы. Рибозимы. Ферменты.
7. Понятие о коферментах. Связь коферментов с витаминами.
8. Общие свойства ферментов: термолабильность, рН-зависимость, специфичность действия.
9. Зависимость между концентрацией субстрата и скоростью ферментативных реакций. Понятие о константе Михаэлиса.
10. Типы ингибирования ферментов: конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное ингибирование.
11. Изоферменты и их значение для энзимодиагностики.
12. Классификация ферментов, характеристика каждого класса ферментов (примеры).
13. Примеры использования ферментов в пищевой промышленности.
14. Химические свойства основных биомолекул растений.
15. Углеводы: Классификация, характеристика и роль.
16. Химический состав растений. Макро-, микро- и ультрамикроэлементы.
17. Какие основные типы растительного сырья существуют.
18. Классификация растительного сырья по назначению и составу.
19. Какие методы предварительной обработки растительного сырья применяются при его переработке (сушка, измельчение, очистка).
20. Какие основные методы переработки растительного сырья применяются в сельском хозяйстве.
21. Суть глубокой переработки зерновых, бобовых и масличных культур.
22. Какие процессы используются для получения продуктов на растительной основе.
23. Какие виды продукции производятся из растительного сырья.
24. Как растительное сырье используется для получения кормовых добавок.
25. Как осуществляется отбор проб растительного сырья для анализа в лабораторных условиях.

Список литературы

Алимов А. М. Биохимия в вопросах и ответах: Учебное пособие для студентов высших и средних учебных заведений / А. М. Алимов, Н. Р. Касанова. –

Казань: Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 2022. – 98 с. – EDN FZADUN.

Алимов А. М. Биохимия сельскохозяйственной продукции (теория и практика): Учебное пособие для студентов, магистрантов (направление подготовки – Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции (ТППСХП) и 36.03.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза (ВСЭ), а также аспирантов и слушателей ФПК / А. М. Алимов, Л. А. Закирова, Н. Р. Касанова. – Казань: ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 2022. – 155 с. – EDN

безопасность продовольственного сырья и пищевых продуктов: учебное пособие / А. М. Алимов, Т. Р. Якупов, Ф. Ф. Зиннатов, Н. Р. Касанова; под редакцией А. М. Алимова. – Казань: КГАВМ им. Баумана, 2019. — 242 с.

биоconversion растительного сырья: учеб. пособие / А.И. Машанов, Н.А. Величко, Е.Е. Ташлыкова. – Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2014. – 223 с.

биоconversion растительного сырья: учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ / А. В. Чернова, Е. С. Землякова. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2022. – 37 с.

биохимия: Учебное пособие для студентов очной формы обучения (направление подготовки 36.03.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза) / Н. Р. Касанова, А. М. Алимов, Е. Ю. Микрюкова [и др.]. – Казань: Вестфалика, 2024. – 78 с. – EDN WOFEEFG.

переработка растительного сырья: учебное пособие / Р.Т. Валеева, С.Г. Мухачев, М.Ю. Шурбина, Д.В. Тунцев. – Казань: Редакционно-издательский центр «Школа», 2023. - 103 с.

технология хранения и переработки продукции растениеводства: краткий курс лекций / М. К. Садыгова, М. С. Марадудин, Н. Л. Моргунова. Саратов: Саратовский ГАУ, 2018. – 98 с.

9. Rasheed F. et al. Modeling to understand plant protein structure-function relationships – implications for seed storage proteins //Molecules. – 2020. – Т. 25. – №. 4. – С. 873.