

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и  
естественных наук

Кафедра "Общая биология и  
биохимия"

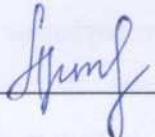
Направление подготовки 44.03.01 Педагогическое образование

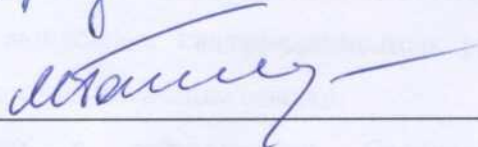
Профиль Биология

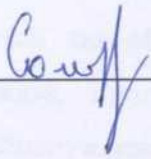
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

"Исследование белков и пептидов в пыльце подсолнечника и  
подсолнечном меде"

Студент  Артюшкина Татьяна Викторовна

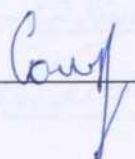
Руководитель  Генгин М.Т.

Нормоконтролёр  Солдатов С.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 2.06.16 № 12)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 15.06.16 № 1)

Секретарь ГЭК  Солдатов С.А.

Пенза, 2016

## Содержание

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| Список сокращений .....                                              | 4  |
| ВВЕДЕНИЕ.....                                                        | 5  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                      | 7  |
| 1.1 Белки их роль в организме .....                                  | 7  |
| 1.1.1 Классификация и свойства белков .....                          | 7  |
| 2.1.2 Влияние белков на организм .....                               | 10 |
| 1.2 Пептиды и их действие на организм.....                           | 12 |
| 1.2.1 Пептиды и их классификация.....                                | 12 |
| 1.2.2 Роль пептидов в организме .....                                | 13 |
| 1.3 Биологическое действие и природа цветочной пыльцы .....          | 15 |
| 1.4 Пчелиная обножка и её свойства.....                              | 19 |
| 1.5. Мед и его значение для организма.....                           | 20 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....                                    | 22 |
| 2.1 Материалы исследования.....                                      | 22 |
| 2. 2 Методы исследования.....                                        | 22 |
| 2.2.1 Количественное определение белка .....                         | 22 |
| 2.2.2 Метод разделения белков и пептидов осаждением ТХУ .....        | 23 |
| 2.2.3. Метод проведения электрофореза белков и пептидов в ПААГ ..... | 23 |
| 2.2.4 Метод микроскопирования .....                                  | 24 |
| 2.3 Статистическая обработка результатов исследования.....           | 25 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....                                | 26 |
| 3.1 Подтверждение подлинности образцов.....                          | 26 |
| 3.2 Построение калибровочного графика.....                           | 28 |

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 Определение количественного содержания белков и пептидов в меде и<br>пыльце подсолнечника ..... | 30 |
| 3.4 Исследование белков в пыльце и меде подсолнечника .....                                         | 33 |
| 3.5 Метод электрофореза в элективном курсе "Основы выбора профессии"<br>.....                       | 37 |
| ВЫВОДЫ.....                                                                                         | 41 |
| Список литературы .....                                                                             | 42 |
| Приложение.....                                                                                     | 45 |

## **Список сокращений**

БСА - бычий сывороточный альбумин

ПААГ - полиакриламидный гель

ТХУ - трихлоруксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

Пептиды и белки представляют собой высокомолекулярные органические соединения, построенные из остатков  $\alpha$ -аминокислот, соединенных между собой пептидными связями.

Ни один из известных нам живых организмов не обходится без белков. Белки выполняют самые разные функции: регулируют обмен веществ, исполняя роль ферментов – катализаторов обмена веществ, способствуют переносу кислорода по всему организму и его поглощению, играют важную роль в функционировании нервной системы, участвуют в передаче генетической информации, являются механической основой мышечного сокращения и т.д. В природе функции белков просто универсальны.

Пептиды уже давно признаны в качестве перспективной группы терапевтических веществ, для лечения различных заболеваний.

Продукты пчеловодства являются перспективным источником биологически-активных веществ для биотехнологии и медицины. К настоящему времени из мёда, маточного молочка и гомогената личинок пчел выделено и охарактеризовано большое количество индивидуальных веществ, комбинации которых широко используются для создания БАДов и лекарственных препаратов. Мед, цветочная пыльца, обножка, маточное молочко, прополис – уникальные продукты природы, содержащие в сбалансированном сочетании ряд важнейших биологически активных компонентов: белков, липидов, аминокислот, витаминов, ферментов, макро- и микроэлементов. Обладая достаточно высокой терапевтической активностью, они действуют мягче, синтетических лекарственных средств, характеризуются высокой степенью безопасности, а относительная дешевизна делает их доступными практически для всех социальных слоев населения (Крылов, 2007). Поскольку биологически активные пептиды влияют практически на все физиологические процессы и регулируют деятельность всех регуляторных систем, перспективным направлением является изучение

пептидного и белкового спектра пчелопродуктов с целью создания новых лекарственных препаратов на их основе.

*Актуальность* данной работы заключается в том, что результаты исследований могут быть использованы для определения биологического происхождения меда (в нашем случае подсолнечного) и его качества. Также белки и пептиды меда и пыльцы представляют собой интерес, как биологически активные вещества для использования их в медицине.

*Целью* работы являлось определение сравнительного содержания белков и пептидов в подсолнечном меде и его пыльце.

Были поставлены следующие *задачи*:

- определение количественного содержания белков и пептидов в меде подсолнечника;
- определение количественного содержания белков и пептидов в пыльце подсолнечника;
- исследование белков в пыльце и меде подсолнечника методом электрофореза в ПААГ;
- исследование качества и некоторых физико-химических свойств пептидов меда и пыльцы подсолнечника.

Полученные данные позволят определить состав меда и пыльцы подсолнечника, а также качественные характеристики их состава.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Белки их роль в организме

### 1.1.1 Классификация и свойства белков

Белки в составе организма занимают особое место. Ф. Энгельс так оценил эту роль белков: *"Жизнь - это способ существования белковых тел, существенным моментом которого является постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка"*. (Энгельс, 1878). И на самом деле, везде, где есть жизнь, находят белковые тела.

Белки – представляют собой неразветвляющиеся полимеры, минимальная структурная единица которых является аминокислота. Аминокислоты соединены между собой пептидной связью. В природе встречается гораздо больше аминокислот, чем входит в состав животных и растительный белков. В состав белков входит 20 аминокислот в альфа-форме, расположенных в различной, но строго определенной для каждого белка последовательности (Ленинджер, 1974).

Белки - это уникальные молекулы, которые в зависимости от своей запрограммированности, могут выполнять самые различные **функции**:

*Структурная* (пластическая) – белками образованы многие клеточные компоненты, а в комплексе с липидами они входят в состав клеточных мембран.

*Каталитическая* – все биологические катализаторы – ферменты по своей химической природе являются белками.

*Транспортная* – белок гемоглобин транспортирует кислород, ряд других белков образуя комплекс с липидами транспортируют их по крови и лимфе (пример: миоглобин, сывороточный альбумин).

*Механохимическая* – мышечная работа и иные формы движения в организме осуществляются при непосредственном участии сократительных

белков с использованием энергии макроэргических связей (пример: актин, миозин).

*Регуляторная* – ряд гормонов и других биологически активных веществ имеют белковую природу (пр.: инсулин, АКТГ).

*Защитная* – антитела (иммуноглобулины) являются белками, кроме того основу кожи составляет белок коллаген, а волос – креатин. Кожа и волосы защищают внутреннюю среду организма от внешних воздействий. В состав слизи и синовиальной жидкости входят мукопротеиды.

*Опорная* – сухожилия, поверхности суставов соединения костей образованы в значительной степени белковыми веществами (пр.: коллаген, эластин).

*Энергетическая* – аминокислоты белков могут поступать на путь гликолиза, который обеспечивает клетку энергией.

*Рецепторная* – многие белки участвуют в процессах избирательного узнавания (рецепторы). (Березов, Коровкин, 1998).

### **Классификация белков**

*По растворимости*, встречаются: водорастворимые, солерастворимые, спирторастворимые, нерастворимые и пр.

*По конформационной структуре*: фибриллярные, глобулярные.

*По химическому строению* делятся на: протеины – состоят только из аминокислот, протеиды – помимо АК имеют в составе небелковую часть (углеводы, липиды, металлы, нуклеиновые кислоты)

*-Протеины:*

*Альбумины* – растворимы в воде, не растворимы в конц. растворах солей.  $pI = 4.6-4.7$ . Существуют альбумины молока, яиц, сыворотки крови.

*Глобулины* – не растворимы в воде, растворимы в солевых растворах. Иммуноглобулины.

*Гистоны* – растворимы в воде, в слабokonцентрированных кислотах. Обладают выраженными основными свойствами. Это ядерные белки, они связаны с ДНК и РНК.

*Склеропротеины* – белки опорных тканей (хрящей, костей), шерсти, волос. Не растворимы в воде, слабых кислотах и щелочах.

а) коллагены – фибриллярные белки соединительной ткани. При длительном кипячении они растворяются в воде и при застудневании образуется желатин.

б) эластины – белки связок и сухожилий. По свойствам похожи на коллагены, но подвергаются гидролизу под действием ферментов пищеварительного сока;

в) кератин – входит в состав волос, перьев, копыт;

г) фиброин – белок шелка, в своем составе содержит много серина;

д) проламины и глюteniны – белки растительного происхождения. (Равич–Щербо, Новиков, 1975)

- *Протеиды*:

Так называемые сложные белки помимо аминокислот содержат простетическую группу, необходимую для выполнения белком его биологической функции. В зависимости от химической природы простетических групп различают несколько классов сложных белков:

*Нуклеопротеиды* – простетическая группа – нуклеиновые кислоты. Среди многочисленных классов нуклеопротеидов наиболее изученными являются рибосомы, состоящие из нескольких молекул РНК и рибосомных белков, и хроматин – основной нуклеопротеид эукариотических клеток, состоящий из ДНК и структурообразующих белков – гистонов (содержатся в клеточном ядре и митохондриях).

*Гемопротеиды* - небелковый компонент этих протеидов – гем, построен из четырех пиррольных колец, с ними связан ион двухвалентного железа (через атомы азота). К таким белкам относятся: гемоглобин, миоглобин, цитохромы. Этот класс белков еще называют хромопротеиды, поскольку гем является окрашенным соединением. Гемоглобин – транспорт кислорода. Миоглобин – запасание кислорода в мышцах. Цитохромы (ферменты) – катализ

окислительно-восстановительных реакций и электронный транспорт в дыхательной цепи.

*Металлопротеиды* – в состав простетической группы входят металлы. Хлорофилл – содержит гем, но вместо железа – магний. Цитохром а – содержит медь, сукцинатдегидрогеназа и др. ферменты содержат негеминовое железо (ферродоксин).

*Липопротеиды* – содержат липиды, входят в состав клеточных мембран.

*Фосфопротеиды* – содержат остаток фосфорной кислоты.

*Глюкопротеиды* – в своем составе содержат сахара (Спирин, 1996).

Белки обладают большой **специфичностью**. Белки животных разных видов, разных индивидуумов одного и того же вида, более того, разных органов и тканей одного и того же организма отличаются друг от друга. Такая специфичность белков делает невозможным введение в организм нерасщепленных чужеродных белков. Если такие чужеродные белки попадают в организм, то это вызывает образование защитных веществ против введенных белков, могут наступить тяжелые нарушения и даже гибель организма. Этим объясняются неудачи при пересадке тканей и органов от животных человеку или даже от одного человека другому. При таких операциях пересаженный орган не приживается и отмирает (Хмельницкий, 1988).

Белковые вещества пищи, проходя через пищеварительный тракт, расщепляются до аминокислот. Аминокислоты легко усваиваются организмом.

### 2.1.2 Влияние белков на организм

#### *Биологическая ценность белков пищи*

Аминокислоты, идущие на построение белков организма, неравноценны. Некоторые аминокислоты *незаменимы* для организма (лейцин, метионин, фенилаланин и др., табл. 1). Если в пище отсутствует незаменимая аминокислота, то синтез белков в организме резко нарушается. Но есть

аминокислоты, которые могут быть заменены другими или синтезированы в самом организме в процессе обмена веществ, - это *заменяемые* аминокислоты.

*Таблица 1. Заменяемые и незаменимые аминокислоты*

| Аминокислоты          |             |
|-----------------------|-------------|
| заменяемые            | незаменимые |
| Аланин                | Аргинин     |
| Аспарагиновая кислота | Валин       |
| Гликокол              | Гистидин    |
| Глутаминовая кислота  | Изолейцин   |
| Глицин                | Лейцин      |
| Норлейцин             | Лизин       |
| Оксилизин             | Метионин    |
| Оксипролин            | Треонин     |
| Орнитин               | Триптофан   |
| Пролин                | Фенилаланин |
| Серин                 |             |
| Тирозин               |             |
| Цистин                |             |
| Цитруллин             |             |

#### *Распад белков в организме*

Аминокислоты, которые не пошли на синтез специфических белков, подвергаются превращениям, во время которых освобождаются азотистые вещества. От аминокислоты при этих превращениях отщепляется азот в виде аммиака ( $\text{NH}_3$ ). Азот в виде аминогруппы ( $-\text{NH}_2$ ), отщепившись от одной аминокислоты, может переноситься на другую, и тогда в организме строятся недостающие ему аминокислоты. Эти процессы идут преимущественно в печени, мышцах, почках. Безазотистый остаток аминокислоты подвергается дальнейшим превращениям с образованием углекислого газа и воды.

Аммиак, образовавшийся при распаде белков в организме, - вещество ядовитое, он обезвреживается в печени, где превращается в мочевины. Мочевина в составе мочи выводится из организма.

Конечные продукты распада белков в организме - не только мочевина, но и мочевая кислота и другие азотистые вещества. Они выводятся из организма с мочой и потом (Пустовалова, 1999).

## 1.2 Пептиды и их действие на организм

### 1.2.1 Пептиды и их классификация

**Пептиды** (греч. *πепτος* — питательный) — группа веществ, их молекулы построены из двух и более остатков аминокислот которые соединены в цепь пептидными (амидными) связями —  $\text{C(O)NH}$  —. Пептидная (амидная) связь — это тип химической связи, которая возникает в результате взаимодействия  $\alpha$ -аминогруппы одной аминокислоты и  $\alpha$ -карбоксигруппы другой аминокислоты. Пептидная связь прочная, и в нормальных клеточных условиях (37 °C, pH=5,0-7,0 (нейтр.)) самопроизвольно не разрывается. Амидная связь разрушается при воздействии на неё таких протеолитических ферментов как, протеазы, пептидгидролазы.

В основном под "пептидами" подразумеваются вещества, состоящие только из  $\alpha$ -аминокислот, но термин также не исключает пептиды, которые получены и из остальных аминокарбоновых кислот (McNaught, Wilkinson, 1997).

В 1900 году немецкий химик-органик Герман Эмиль Фишер выдвинул гипотезу о том, что пептиды состоят из цепочки аминокислот, образованных определёнными связями. И уже в 1902 году он получил неопровержимые доказательства существования пептидной связи, а к 1905 году разработал общий метод, при помощи которого стало возможным синтезировать пептиды в лабораторных условиях.

Пептиды постоянно синтезируются во всех живых организмах для регулирования физиологических процессов. Свойства пептидов зависят, главным образом, от их первичной структуры — последовательности аминокислот, а также от строения молекулы и её конфигурации в пространстве (вторичная структура).

#### *Классификация*

По числу аминокислот, содержащихся в пептиде, различают ди-, три- тетра-, пента-, ..., окта-, нона-, декапептид и т. д. Чтобы избежать проблемы, связанной с греческой нумерацией длинноцепочечных пептидов, Бодански

предложил количество аминокислотных остатков пептида обозначать арабской цифрой и помещать перед словом «пептид». Например, 7 пептид, вместо гептапептид, 10-пептид, вместо декапептид (Якубке, Яшкайт, 1985).

Последовательность пептидов, длинна которая короче 10-20 аминокислотных остатков, может также называться олигопептиды, при большей длине последовательности будет называться полипептиды. Белками же обычно называют полипептиды, которые содержат более 50 аминокислотных остатков (Liebesq, 1992).

Различие между полипептидами и белками (макропептидами) чрезвычайно проблематично. Исторически сложилось так, что границей между полипептидами и белками считают соединения с молекулярной массой ~ 10 000, т. е. состоящие примерно из 100 остатков аминокислот. Такой принцип классификации основан на способности к диализу, через природные мембраны.

### **1.2.2 Роль пептидов в организме**

Пептиды широко распространены в природе. Они присутствуют во всех клеточных организмах (пептидный пул). В настоящее время трудно систематически классифицировать пептиды по химическим и физическим критериям, поэтому обычно за основу берут и физиологическое действие. природные пептидные вещества наиболее изучены по своему действию пептидные гормоны, они имеют и наиболее известную структуру. Важные пептидные гормон образуются:

- в гипоталамус (окситоцин и вазопрессин),
- в поджелудочной железе (инсулин, глюкагон), в гипофизе (адренокортикотропин, меланоцитстимулирующий гормон),
- в щитовидной железе (тирокальцитонин),
- в паращитовидной железе (парат-гормон),
- в желудочно-кишечном тракте (гастрин, секретин, холецистокининпанкреозимин).

Пептидные гормоны ЖКТ (так же, как и ангиотензин, плазмакинин) не вырабатываются специальной железой, их относят к тканевым пептидным гормонам (тканевым гормонам). Иногда довольно трудно отнести гормоны к какой-то определенной группе, в связи с их неоднозначными физиологическими функциями.

Большое значение приобретают пептиды из животных и растительных ядов, а также пептидные антибиотики из микроорганизмов.

Все чаще большой интерес вызывают биологически активные пептиды, действующие на ЦНС. Такие пептиды называют нейропептидами. Влияние нейропептидов на ЦНС очень многообразно:

- контроль физиологического сна,
- обезболивающее (опиоидные пептиды),
- роль в процессе переработки информации (нейрогипофизарный гормон),
- участие в процессах регенерации клеток,
- защита организма от попавших в него токсинов (пептиды иммунологического действия),
- лекарственные вещества,
- регуляция аппетита (эндорфины, нейропептид-У, лептин и др.),
- регуляция ВНД, биохимических процессов, механизмов памяти, обучения, возникновения чувства страха, ярости и др.;
- пептиды, которые регулируют артериальное давление и тонус сосудов (ангиотензин II, брадикинин и др.).
- сладкие пептиды (аспартам),
- горькие пептиды из продуктов ферментации (соевый соус, сыр и т.д.),
- пептиды из белков рыбы или говядины улучшают вкус пищи,
- и другие пептиды широко используются в пищевой промышленности.

Однако такое деление условно, так как действие многих пептидов не ограничивается каким-либо одним направлением. Так, например,

вазопрессин, помимо сосудосуживающего и антидиуретического действия, улучшает память.

Для правильной работы клеток и тканей необходимо адекватное количество пептидов. С возрастом и при патологии возникает существенный дефицит пептидов, который существенно ускоряет износ тканей, что приводит к старению всего организма. Сегодня проблему недостаточности пептидов в организме научились решать. Пептидный пул клетки восполняют синтезированными в лабораторных условиях короткими пептидами (Якубке, Яшкайт, 1985).

### **1.3 Биологическое действие и природа цветочной пыльцы**

Цветочная пыльца - это мужские половые клетки цветковых растений, продукт пыльников, окружающих пестик в центре цветка. (Шемяков, Шапиро, Данусевич, 1987).

По внешнему виду пыльца представляет собой очень мелкий порошок, состоящий из отдельных, очень маленьких пыльцевых зёрен. У разных растений они отличаются по цвету, оттенку, величине, форме и фактуре поверхности. Благодаря этому под микроскопом можно установить, от какого вида растения взята пыльца или с каких цветов пчела собирала нектар. (Младенов, 1969).

Цветочная пыльца имеет специфический пряный, медовоцветочный запах и сладковатый вкус. Цвет пыльцы может быть всевозможных цветов и оттенков от белого до чёрного. Окраска пыльцевых зёрен обусловлена растительными пигментами каротиноидами и флавоноидами, играющими важную роль в окислительно-восстановительных процессах клеток. Флавоноидные пигменты участвуют также в обеспечении иммунитета растений, будучи токсичными для различных бактерий (Максимов, 2012).

Пыльцевое зерно состоит из одной клетки, покрытой двумя оболочками — интиной и экзиной.

При отсутствии пыльцы в улье пчёлы прекращают выращивать расплод. Они заготавливают этот продукт и используют для выработки маточного молочка, воска, а также для кормления расплода (Билаш, 1991).

По химическому составу пыльца представляет собой сложный продукт, состоящий из пищевых и биологически активных веществ. В состав её входят белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты, зольные элементы, витамины и другие биологически важные вещества. Ниже приведен примерный состав цветочной пыльцы в граммах на 100 гр. продукта: вода (21,3 - 30,0), сухое вещество (70,0 - 81,7), белок (сырой протеин) (7,0 - 36,7), углеводы (всего 20,0 - 38,8; в том числе: фруктоза 19,4 глюкоза 14,1), липиды (жиры и жироподобные вещества) (1,38-20,0), зольные элементы (0,9 - 5,5).

В белках содержатся многие важные аминокислоты: аланин, глутаминовая кислота, фенилаланин, триптофан, цистин, аспарагиновая кислота и др. Белок пыльцы по содержанию незаменимых аминокислот превосходит белок молока, являющегося одним из наиболее полноценных (Херольд, 2007).

Липиды пыльцы представлены жирами и жироподобными веществами (фосфолипидами, фитостеринами и др.). В состав жиров входят олеиновая, пальмитиновая, стеариновая, линолевая, линоленовая и др. жирные кислоты.

В комплексе линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты обладают F-витаминной активностью, регулируя гормональные процессы в организме человека, а также снижая количество холестерина крови и выведение его из организма. (Бандюкова, Шапиро, 1985).

Фосфолипиды входят в состав мембран клеток организма человека, избирательно регулируют поступление ионов, принимая активное участие в обмене веществ. Фитостерины противодействуют атеросклерозу, являясь антагонистом холестерина в организме.

Значительную долю углеводов в пыльце составляют глюкоза и фруктоза. Из других сахаров имеются дисахариды — мальтоза и сахароза, а также полисахариды — крахмал, клетчатка и пектиновые вещества.

Пыльца содержит большое количество витаминов (мг в 100 гр. сухого вещества): каротина (А), тиамина (В<sub>0</sub>), рибофлавина (В<sub>2</sub>); никотиновой кислоты (В<sub>5</sub>, РР); пантотеновой кислоты (В<sub>3</sub>); пиридоксина (В<sub>6</sub>) - 0,30-0,90; биотина (Н) и др., а также аскорбиновой кислоты. Количество витаминов уменьшается при консервации пыльцы сахарной пудрой (Шабаршов, 2005).

Из зольных элементов в состав пыльцы входят: калий, фосфор, кальций, магний, медь, железо, кремний, серу, хлор, титан, марганец, барий, серебро, золото, палладий, цинк, мышьяк, олово, стронций, уран, алюминий, таллий, свинец, бериллий и др. (всего более 28 элементов). Они являются стимуляторами физиологических и биохимических процессов в организме (Гребенников, 2007).

В пыльце содержатся фенольные соединения - флавоноиды и фенолокислоты (активная биологическая группа веществ, действующая на неоплазму). Эти вещества обладают капилляроукрепляющим, противовоспалительным, противоатеросклеротическим, радиозащитным (антирадиантным), противоокислительным, желчегонным, мочегонным, противоопухолевым и др. свойствами. (Шемяков, Шапиро, Данусевич, 1987).

Качественный и количественный состав пыльцы обуславливает важную роль в развитии растений и передаче наследственных признаков вида. (Шемяков, Шапиро, Данусевич, 1987).

В ней содержится более 200 веществ, 50 из которых являются биологически активными. Цветочная пыльца содержит в себе белки, сахара, жиры, минеральные соли, почти все витамины, ферменты, фитогормоны, антибиотики и т.д. Все они количественно сбалансированы, что позволяет использовать пыльцу при лечении большинства заболеваний. (Хисматуллина, 2005).

Приём пыльцы улучшает количество эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина в крови, что позволяет использовать её при анемиях (малокровии) и лучевой болезни. По этому эффекту она превосходит традиционные антианемические средства (Новиков, 2007).

Пыльца стимулирует рост и регенерацию повреждённых тканей, в том числе и печёночной, что ведет к восстановлению функции печени, оказывает желчегонное, мочегонное, радиозащитное и противоопухолевое действие (Benincasa, 2015).

Пыльца задерживает рост микроорганизмов в кишечнике и регулирует его функцию. Она оказывает влияние на кишечную, дизентерийную и др. палочки. Сильнее действует ивовая пыльца. Пыльцой излечиваются сильные запоры, энтероколиты, дисбактериоз кишечника (Иориш, 1954).

Пыльца нормализует деятельность нервной и эндокринной системы, активизирует процесс выделения инсулина клетками поджелудочной железы, в связи с чем её применяют в лечении сахарного диабета (Пересадин, 2006).

Пыльца укрепляет капилляры (в частности сосуды головного мозга), снижает содержание холестерина в крови, обладает антисклеротическим свойством, вызывает некоторое снижение свертываемости крови, в связи с чем её используют при лечении атеросклероза и ишемической болезни сердца, снижает артериальное давление (Шапиро, 1885).

Пыльца полезна при нарушениях микроциркуляции, замедлении ритма сердца, нарушениях диуреза, гематурии, глаукоме, отеках, экземе, псориазе, при нормализации психики (Кайяс, 1998).

Пыльца влияет на восстановление обменных процессов при старении. Воздействуя на иммунную систему пыльца укрепляет организм, повышает аппетит, восстанавливает и увеличивает вес тела, повышает умственную и физическую работоспособность, усиливает половое влечение и мужскую половую потенцию, вызывает уменьшение признаков гипертрофии предстательной железы.

Пыльцу используют при подагре для уменьшения уровня мочевой кислоты, а также для снятия синдрома похмелья (Иойриш, 1961).

Пыльца, в комплексе с другими медикаментами, усиливает их действие, позволяет уменьшить их дозу, а иногда и заменить. Биологическую активность пыльца почти полностью теряет через год. Эти изменения

уменьшаются при охлаждении пыльцы. В перге они сохраняются значительно лучше, поэтому и лечебный эффект её применения оказывается более высоким (Иойриш, 1976).

#### **1.4 Пчелиная обножка и её свойства**

Основную массу пчелиной обножки составляют пыльцевые зерна цветков, посещаемых пчелами, которые прилипают к волоскам их хитинового покрова (в том числе благодаря статическому заряду). Пчела, ползая по цветкам (или в полете), собирает пыльцевые зерна с помощью специальных выростов на голени задней ножки (пыльцевого гребешка) в «корзиночку» – углубление на наружной стороне голени, окаймленное волосками. Здесь в обеих корзиночках задних ног пыльца склеивается в виде шариков – обножек. Кроме пыльцы растений, обножки содержат еще нектар (или мед) из медового зобика и секреты, выделяемые слюнными железами в тот момент, когда пчела прокусывает пыльники цветков и набирает пыльцу в рот (не исключены и секреты желез, открывающихся на поверхность тела пчелы). Об этих пчелиных добавках свидетельствуют различия в химическом составе пчелиной обножки и пыльцы, вручную собираемой с цветов [39].

Пыльца обножка имеет следующий *химический состав*:

- разнообразные витамины: А, В1, В2, биотин, Е, С, К;
- микроэлементы (около 28) – хлор, йод, калий, ванадий, кальций;
- фолиевая и пантотеновая кислоты;
- аминокислоты, некоторые из них не способны синтезироваться в организме человека;
- от 30 до 60 % – углеводы: глюкоза, ксилоза, крахмал, фруктоза, а еще фитогормоны и анти бактерицидные вещества;
- различные фосфолипиды, фитостерины.

Интересным фактом является то, что пчелиная пыльца гораздо богаче меда. Например, в ней около 7-30% протеинов, а аминокислот до 13%, а это в 5-6 раз больше, нежели у богатых ими продуктов.

Десять из таких веществ не способны вырабатываться самостоятельно в организме, поэтому необходимо обогащаться ими вместе с пищей. В пыльце недавно обнаружили стимулятор роста (Хорн, Лейбольд, 2006)

### **1.5. Мед и его значение для организма**

Среди продуктов пчеловодства наиболее распространенным является мед. С самых ранних лет человек слышит определенный указ о том, что мед кушать полезно. Полезность меда заключается в том, что он является единственным натуральным продуктом, который усваивается организмом человека на 100%, а т.е. пчелопродукт не требует энергии на расщепление, он напрямую попадает в кровь. Отсутствие чувства утомления, как обычно бывает после сытной трапезы - вот результат питательности меда. Секрет меда и его полезных качеств следует искать именно в составе: вода (15%), углеводы: фруктоза, глюкоза, сахароза, мальтоза (80%), белки, аминокислоты, энзимы (0,5%), жиры (0,2%), витамины: А, В, РР, С, D, Е, Н, К, минералы: калий, кальций, фосфор, натрий, магний, железо, цинк, органические кислоты, такие как: муравьиная, глюконовая, масляная, щавелевая, молочная, фитонциды, ацетилхолин (гормон роста). Следует заметить, что мед состоит из 300 компонентов. И около трети из них еще не имеют названия. Ученые бьются над изучением оставшихся микроэлементов, выводя гипотезы о присутствии в составе некоего революционного компонента, способного побороть даже палочку Коха. Пчелопродукт весьма универсален, если говорить о его лечебных свойствах, его используют как средство: иммуноукрепляющее, противовирусное, питательное, противовоспалительное, заживляющее, успокаивающее, мочегонное, противомикробное и т.д. Мед и его лечебные свойства помогают избавиться от сложных заболеваний органов и их систем, в частности его применяют при проблемах с сердечнососудистой системой, желудочно-кишечным трактом, печенью, мочеполовой системой, нарушениями обмена веществ, дыхательными органами, нервной системой, расстройствами сексуального характера, кожей, зрением. Пользу меда для

организма сложно переоценить. Еще Авиценна обратил на него особое внимание, называя «панацеей». Мед считается одним из основных энергетических материалов для организма за счет большого содержания углеводов. За счет белков, участвует в образовании разного рода гормонов и энзимов. Пчелопродукт активно влияет на повышение качества жизнедеятельности организма, поскольку является стимулятором биологического происхождения. Протеины и аминокислоты, содержащиеся в меде, – это незаменимые вещества для реабилитации организма после болезни, переутомления или истощения. Помогает устранить различные воспалительные процессы организма за счет содержания фитонцидов, которые оказывают сильный антибиотический и антибактериальный эффект. В целом, мед является основой здоровья человека, что всегда под рукой.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы исследования

Исходными материалами исследования являлись пыльца подсолнечника и подсолнечный мед.

Для приготовления *20% экстракта* на лабораторных аналитических весах (AXIS-1530) взвешивали навеску пыльцы массой 20 г с последующим растиранием ее в фарфоровой ступке с добавлением 100 мл воды. Далее использовался метод замораживания и оттаивания материала, в результате чего, образующиеся кристаллы льда разрушали субклеточные структуры. Потом полученную суспензию отфильтровывали на холоде 1 раз через фильтр состоящий из слоя ваты с марлей. И нерастворимые части осаждали центрифугированием на рефрижераторной центрифуге при 10000 об. 20 мин. После этого осадок удаляли, а супернатант отфильтровывали, так же на холоде, 2 раза через фильтровальную бумагу и 1 раз через хроматографическую до получения прозрачного раствора.

Полученный экстракт замораживался при -40 С градусах и хранился не более месяца.

*15% экстракт* обножки пыльцы готовили аналогично экстракту пыльцы подсолнечника.

Для приготовления *50 % раствора* на лабораторных аналитических весах (AXIS-1530) взвешивали навеску меда подсолнечника массой 50 г с добавлением 100 мл воды. Полученный экстракт замораживался при -40 С градусах и хранился также не более месяца.

### 2. 2 Методы исследования

#### 2.2.1 Количественное определение белка

Перед началом исследования необходимо было определить концентрацию белка в исследуемых экстрактах. Количественное определение белка осуществлялось по методу Лоури, одного из колориметрических методов. В качестве стандарта использовался бычий БСА. (Дарбре, 1989).

Перед началом работы необходимо было приготовить следующие реагенты: реактив А и реактив В. Реактив С готовили смешиваем 50 мл реактива В с 1 мл реактива А. А для непосредственного обнаружения белков и пептидов использовался реактив Фолина, который представляет собой водный раствор фосфорновольфрамовой кислоты (Шапиро, 1976).

После инкубации колориметрировали на фотоэлектроколориметре (Соловьев, Генгин, 2012).

После этого необходимо было построить градуировочный график по стандартному раствору с известной концентрацией (Уильямс, 1987).

### **2.2.2 Метод разделения белков и пептидов осаждением ТХУ**

Метод осаждения белков при помощи трихлоруксусной кислоты. Это нужно для того, чтобы узнать процентную составляющую белков и пептидов.

Далее работа шла в двух направлениях. В первом случае - определение общего белка. Параллельно этому опыту шло осаждение белков 4 %-й ТХУ; после чего проводили метод Лоури (Скоупс, 1985).

### **2.2.3. Метод проведения электрофореза белков и пептидов в ПААГ**

Для качественного анализа белков использовали электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с модификациями. Для этого использовали электрофоретическую установку Helicon и универсальный источник питания «Эльф-8».

Электрофорез проводили в 7,5% ПААГ. Для этого использовали необходимые растворы и буферы в количествах, указанных в таблице 1.

*Таблица 2. Приготовление 7,5% ПААГ*

| Реактивы                                 | Разделяющий гель | Концентрирующий гель |
|------------------------------------------|------------------|----------------------|
| Концентрат геля (30% раствор акриламида) | 1,250 мл         | 0,170 мл             |
| Буфер для концентрирующего геля          | -                | 0,780 мл             |

|                                                      |          |          |
|------------------------------------------------------|----------|----------|
| (0,5 М Tris-HCl, pH 6,8)                             |          |          |
| Буфер для разделяющего геля (1,5 М Tris-HCl, pH 8,8) | 3,400 мл | -        |
| ТЕМЭД                                                | 0,100 мл | 0,015 мл |
| 10% раствор персульфата аммония                      | 0,250 мл | 0,035мл  |
| Суммарный объем                                      | 5,0 мл   | 1,0 мл   |

Температура полимеризации 23°C. Время полимеризации составило 15 минут.

В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер pH = 8,3 (0,025 М Tris-HCl (3 г), 0,192 М глицин (24,4 г) на 1000 мл воды).

В ячейки концентрирующего геля наносили образцы по 20 мкл в градиенте 0,25 М раствора сахарозы. Силу тока устанавливали на 10 мА при электрофорезе в 7,5% ПААГ в течение 30 минут до формирования четкой полосы красителя 0,01% раствора бромфенолового синего на границе концентрирующего и разделяющего гелей, затем силу тока увеличивали до 25 мА в системе 7,5% ПААГ до окончания электрофореза, который определяли моментом достижения красителя бромфенолового синего расстояния 0,5 – 1 см от нижнего края геля.

Окрашивание пластины проводили раствором для фиксации и окрашивания геля в течение 20 минут. Далее многократно промывали отмывающим раствором (400 мл воды, 50 мл уксусной кислоты, 50 мл изопропанола).

#### 2.2.4 Метод микроскопирования

Как основные средства измерения, вспомогательные устройства и материалы использовались: микроскоп биологический Микромед-2, препаровальная игла, стекло предметное, стекло покровное по ГОСТ 6672, палочка стеклянная, пинцет.

Реактивы: вода дистиллированная, этиловый спирт 96%, эфир.

Для исследования морфологии пыльцевых зёрен проводят микроскопирование препаратов. Просмотр пыльцевых зёрен производят под микроскопом при увеличении в 400 раз. Измерение экваториального диаметра (Э.д.) и длины полярной оси (П.о.) проводят у 5 пыльцевых зёрен, случайно попавших в поле зрения.

Идентификацию пыльцевых зёрен обножки проводили путём их сравнения с пыльцевыми зёрнами растений по атласу пыльцы энтомофильных растений и по определителям (Сладков, 1962).

### **2.3 Статистическая обработка результатов исследования**

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007» (Шмидт, 1984).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Подтверждение подлинности образцов

Тычинки цветков содержат множество мелких порошковидных зерен, называемых пылью или микроспорами. Пыльца является питательным кормом для многих насекомых, включая и пчел, которые собирают её в больших количествах для вскармливания расплода. Пыльца отличается не только по цвету, размеру, форме, но и по составу. Включает в себя большое количество ценных пищевых и лекарственных веществ - белки, жиры, углеводы, витамины, минеральные вещества, гормоны и фитонциды.

В данной работе проводили исследование на пыльце и меде подсолнечника. Пыльца была собрана вручную с двух полей подсолнечника. Результаты микроскопирования препарата представлены на рисунке 1.

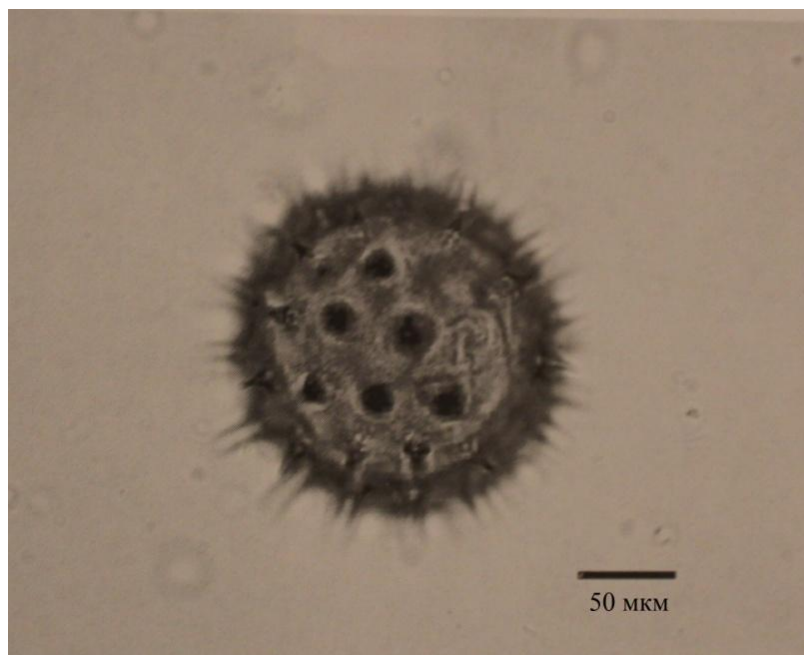


*Рис. 1. Пыльца подсолнечника.*

Пыльцевые зерна представляют из себя трехбороздно-оровые, сфероидальные, крупные объекты. Имеют округлые или слабо-3-лопастные очертания в полярном положении, в экваториальном – округлые. Борозды длинные, широко открытые; оры четкие, округлые, небольшие. Экзина пыльцы подсолнечника толстая, гомогенная, скульптурированная. Скульптура шиповатая. В полярном положении мезокольпие 5 шипов.

Шипы высокие, конические. Контур пыльцевого зерна шиповатый (Кривцов, Савин, Сокольский, Полева, Билаш, Докукин, 2009).

При изучении препаратов из пыльцы, иногда обнаруживается некоторое количество деформированных пыльцевых зерен, что может затруднять определение их принадлежности. Деформация зерен выражается в изменении их очертаний и размеров, увеличение или уменьшение числа апертур. Изменению также подвергается экзина, которая, может быть более тонкой или более толстой. Скульптурные элементы, например, шипы, тоже могут быть уменьшены в размере и несколько деформированы (Миронюк, 2007).

Изменение пыльцевых зерен обусловлено различными причинами. Л.А.Куприянова указывает, что часто к этому ведут ранние заморозки, гибридизация, нарушение условий существования растений в связи с введением в культуру, особенно если имеется значительная разница между естественными и новыми условиями обитания. Следовательно, исходя из изложенного, при анализе пыльцы не стоит принимать во внимание пыльцевые зерна с морфологическим дефектом (Куприянова, 1978).

Мед был собран с одного поля в том же районе (Малосердобинский район Пензенской области), что и пыльца.

Мед на подлинность проверен не был, т.к. соответствовал всем правилам сборки. Также 1 л.данного меда имел вес около полтора кг (1,4 кг), мед довольно быстро кристаллизовался и т.д, что соответствует его описанию (Кривцов, Савин, Сокольский, Полева, Билаш, Докукин, 2009). Хотелось бы отметить, что есть официальный документ утвержденный Минсельхозпродом, в котором говорится о нектарных эквивалентах, об удельном содержании пыльцевых зерен в медах, о «замечательном» показателе, помогающем выявлять фальсифицированный мед «представленность пыльцы», регламентирующем « не менее 3 - 5 пыльцевых зерен в 7 из 10 полей зрения» в «Правилах ветеринарно-санитарной экспертизы меда при продаже на рынках» (утв. Минсельхозпродом РФ

18.07.1995 N 13-7-2/365) (Зарегистрировано в Минюсте РФ 31.08.1995 N 942).

Обножка пыльцы подсолнечника была приобретена у этого же пасечника соответственно.

### 3.2 Построение калибровочного графика

Для начала мы определили концентрацию белка в исследуемых объектах. Количественное определение белка осуществлялось по методу Лоури, одного из колориметрических методов. Возникающая окраска в основном определялась реакцией реагента Фолина с остатками тирозина. В качестве стандарта использовался бычий сывороточный альбумин

Мы старались добиться такой концентрации исходных экстрактов, чтобы значения располагались в интервалах концентраций стандартного калибровочного графика. И таким образом можно было сделать пересчет, а потом и вывод о концентрации белка в растворе.

Измерения производили на фотоколориметре (Фотометре-КФК-3) при длине волны 750 нм в кювете № 3,066 против контроля.

*Таблица №3.*

| №  | Конц.<br>БСА,<br>мкг/мл | БСА,<br>мл | H2O,<br>мл | Повтор-<br>ть №1 | Повтор-<br>ть №2 | Повтор-<br>ть № 3 | Среднее,<br>D | D - K  |
|----|-------------------------|------------|------------|------------------|------------------|-------------------|---------------|--------|
| 1  | 10                      | 0,5        | 4,5        | 0,028            | 0,027            | 0,029             | 0,028         | 0,008  |
| 2  | 20                      | 1          | 4,0        | 0,044            | 0,042            | 0,043             | 0,043         | 0,023  |
| 3  | 30                      | 1,5        | 3,5        | -                | 0,056            | 0,057             | 0,0565        | 0,0365 |
| 4  | 40                      | 2,0        | 3,0        | -                | 0,07             | 0,073             | 0,0715        | 0,0515 |
| 5  | 50                      | 2,5        | 2,5        | 0,094            | 0,091            | -                 | 0,0925        | 0,0725 |
| 6  | 60                      | 3,0        | 2,0        | 0,104            | -                | 0,106             | 0,105         | 0,085  |
| 7  | 70                      | 3,5        | 1,5        | 0,115            | -                | 0,103             | 0,109         | 0,089  |
| 8  | 80                      | 4,0        | 1,0        | 0,123            | -                | 0,125             | 0,124         | 0,104  |
| 9  | 90                      | 4,5        | 0,5        | -                | 0,128            | 0,131             | 0,1295        | 0,1095 |
| 10 | 100                     | 5,0        | 0          | -                | 0,137            | 0,14              | 0,1385        | 0,1185 |
| K  | 0                       | 0          | 5          | 0,020            | 0,021            | 0,020             | 0,020         | -      |

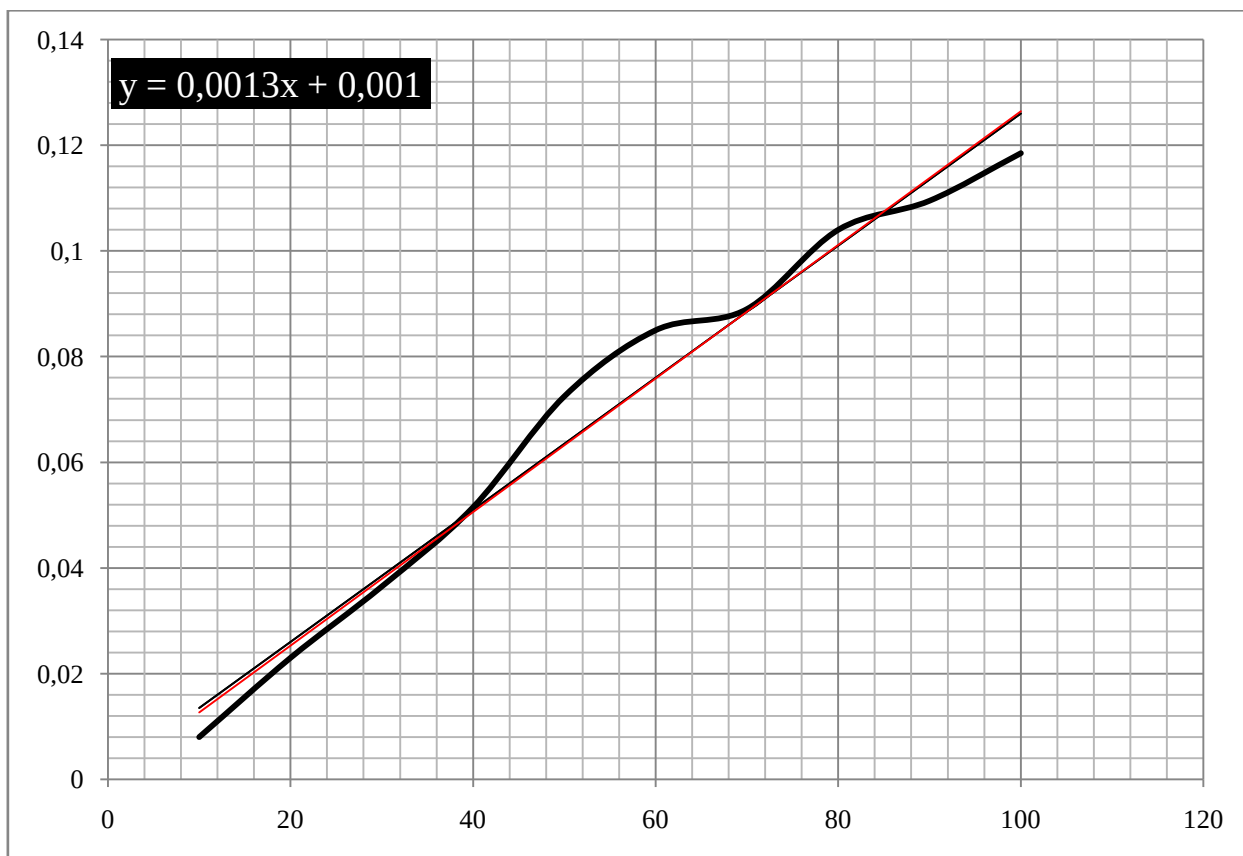


Рис. 2 Калибровочный график №1.

Было вынесено предположение о том, что дальнейшее использование калибровочного графика №1 возможно только при условии, если дальнейшее определение белка будет происходить только в кювете, что использовалась для составления графика при измерении (в нашем случае это кювета №3,066). И только тогда полученные данные будут верны.

Был проведен эксперимент: полученные пробы мы измерили на кювете № 10, результаты представлены в таблице №4:

Таблица №4.

| № | Конц. БСА, мкг/мл | БСА, мл | H2O, мл | Повтор-ть №1 | Повтор-ть №2 | Среднее, D | D - K |
|---|-------------------|---------|---------|--------------|--------------|------------|-------|
| 1 | 10                | 0,5     | 4,5     | 0,154        | 0,157        | 0,156      | 0,135 |
| 2 | 20                | 1       | 4,0     | 0,229        | 0,222        | 0,226      | 0,205 |
| 3 | 30                | 1,5     | 3,5     | 0,273        | 0,288        | 0,281      | 0,260 |
| 4 | 40                | 2,0     | 3,0     | 0,333        | 0,334        | 0,334      | 0,313 |
| 5 | 50                | 2,5     | 2,5     | 0,406        | 0,403        | 0,405      | 0,384 |
| 6 | 60                | 3,0     | 2,0     | 0,485        | 0,467        | 0,476      | 0,455 |
| 7 | 70                | 3,5     | 1,5     | 0,510        | 0,517        | 0,514      | 0,493 |

|    |     |     |     |       |       |       |       |
|----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|
| 8  | 80  | 4,0 | 1,0 | 0,549 | 0,572 | 0,561 | 0,540 |
| 9  | 90  | 4,5 | 0,5 | 0,668 | 0,651 | 0,660 | 0,639 |
| 10 | 100 | 5,0 | 0   | 0,668 | 0,651 | 0,695 | 0,674 |
| K  | 0   | 0   | 5   | 0,020 | 0,021 | 0,021 | -     |

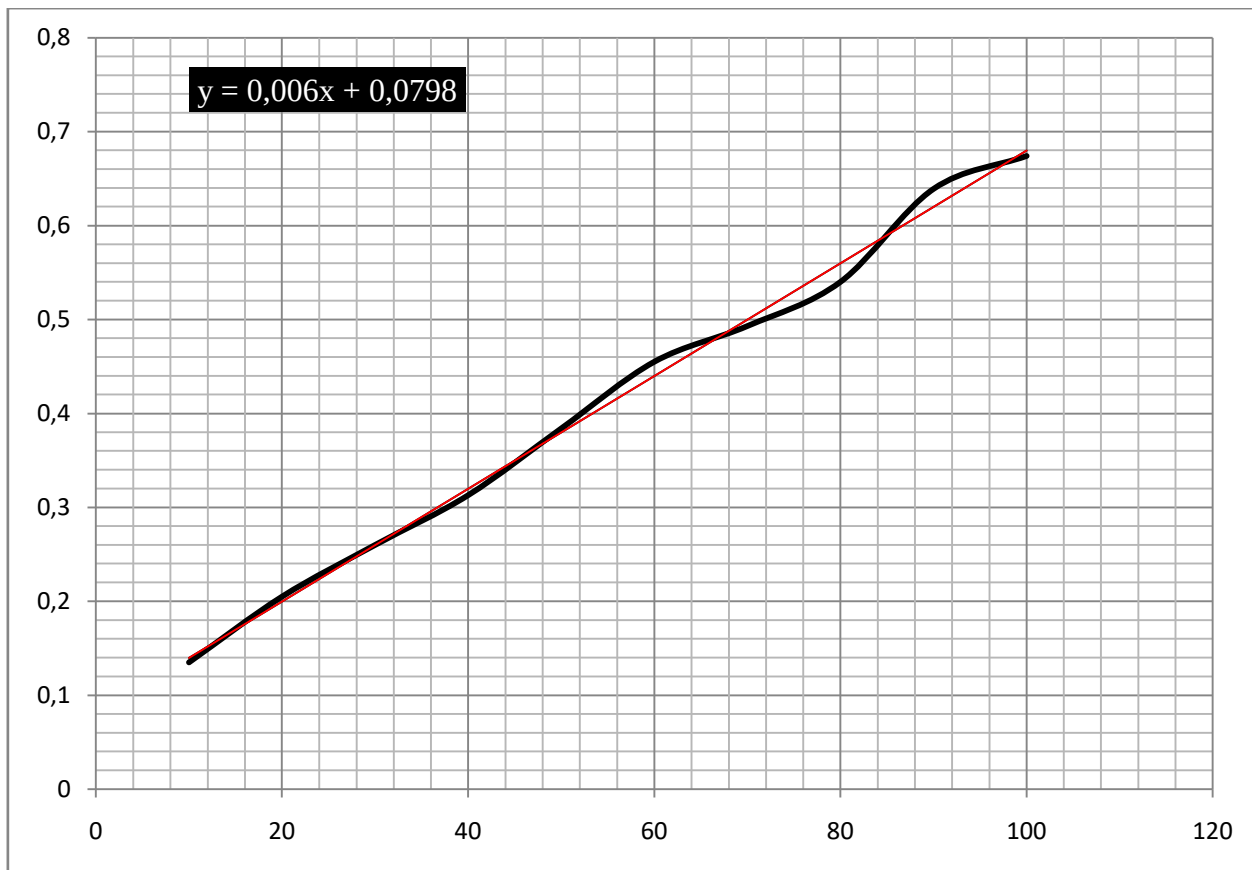


Рис. 3 Калибровочный график №2.

Мы можем сделать следующий вывод о том, что предположение было верным, и если при дальнейших исследованиях будет использоваться другой график для определения концентрации белка, отличный по кювете от калибровочного графика, то результаты будут неверными.

### 3.3 Определение количественного содержания белков и пептидов в меде и пыльце подсолнечника

Для определения количественного содержания белков и пептидов в пыльце и меде подсолнечника был использован метод осаждения фракций белков трихлоруксусной кислотой.

Работа шла в двух направлениях. В первом случае определялось общее количество белка: было взято 0,5 мл суспензии пыльцы и "на Лоури". Во

втором случае - производили осаждение белков 4 %-й ТХУ: брали 1 мл суспензии пыльцы добавляли к нему 1 мл 4 % -й ТХУ и инкубировали при комнатной температуре 20 мин; далее осажденный белок удаляли центрифугированием на лабораторной центрифуге ОПН-8 25 мин при 5000 об. После центрифугирования супернатант брали так же 0,5 мл и проводили метод Лоури (Скоупс, 1985).

Идентично же ставился опыт и с обножкой, и с медом.

Полученные результаты были следующими:

*Таблица №5.*

| 20% экстракт пыльцы  |             |       |       |        |
|----------------------|-------------|-------|-------|--------|
| Исследуемые вещества | Повторность |       |       | Дср.   |
|                      | 1           | 2     | 3     |        |
| Общий белок          | 0,016       | -     | 0,016 | 0,016  |
| Пептиды              | -           | 0,008 | 0,007 | 0,0075 |

*Таблица 6.*

| 15% экстракт обножки |             |       |       |        |
|----------------------|-------------|-------|-------|--------|
| Исследуемые вещества | Повторность |       |       | Дср.   |
|                      | 1           | 2     | 3     |        |
| Общий белок          | 0,014       | -     | 0,014 | 0,014  |
| Пептиды              | 0,007       | 0,008 | -     | 0,0075 |

*Таблица 7*

| 50% раствор меда     |             |       |       |        |
|----------------------|-------------|-------|-------|--------|
| Исследуемые вещества | Повторность |       |       | Дср.   |
|                      | 1           | 2     | 3     |        |
| Общий белок          | 0,014       | -     | 0,013 | 0,0135 |
| Пептиды              | 0,007       | 0,007 | -     | 0,007  |

Следующим этапом является подсчет белков и пептидов относительно их оптической плотности, опирающийся на формулу калибровочного графика №1:

$$y=0,0013x+0,001$$

$$x=y-0,001/0,0013$$

#### 20% экстракт пыльцы

*Общий белок:* 230,8 мкг/мл

*Пептиды:* 100 мкг/мл

*Белки:*

общий белок: 230,8 мкг/мл – 100%

пептиды: 100 мкг/мл – x%

$$x=43\%$$

белки: 100%-43%=57%

#### 15% экстракт обножки

*Общий белок:* 200 мкг/мл

*Пептиды:*

*Белки:*

общий белок: 200 мкг/мл – 100%

пептиды: 100 мкг/мл – x%

$$x=50\%$$

белки: 100%-50%=50%

#### 50% раствор меда

*Общий белок:* 210 мкг/мл

*Пептиды:* 96,6 мкг/мл

*Белки:*

общий белок: 210 мкг/мл – 100%

пептиды: 96,6 мкг/мл – x%

$$x=46\%$$

белки: 100%-45%=46%

Исходя из полученных результатов, можем сделать следующий вывод о том, что процентное содержание белков и пептидов в пчелопродукте равно  $\pm 50\%$

Для дальнейшего исследования белков был использован уникальный наглядный метод Электрофореза в ПААГ.

### 3.4 Исследование белков в пыльце и меде подсолнечника

Исследование белкового спектра в экстракте пыльцы и меде подсолнечника происходило путем метода электрофорез в 7,5% ПААГ.

Для начала проводили подбор наиболее оптимальных условий для электрофореза, при которых наблюдалось бы разделение белков продуктов пчеловодства на наибольшее количество идентифицируемых зон.

Электрофорез проводили в 7,5% ПААГ – блоке. В ячейку геля наносили до 300-400 мкг белка в объеме 40 мкл. Электрофорез проводили в 0,025 М трис-глициновом буфере рН 8,3 при напряжении 120 В и силе тока 25 мА до вхождения образцов в гель и при напряжении 180 В и силе тока 50 мА после вхождения образцов в гель. В качестве лидирующего красителя использовали бромфеноловый синий. После достижения фронта красителя 4/5 пластины геля, электрофорез прекращали. Для идентификации белковых зон по завершении электрофореза гелевую пластинку помещали на 30 минут в фиксирующий раствор (125 мл изопропанола, 50 мл уксусной кислоты, 325 мл воды, 1,25 г Кумасси R-250). Отмывку геля от красителя осуществляли в течение суток смесью уксусная кислота-этанол-вода в соотношении 10-1-30.

Электрофорез белков разделяет белки сыворотки на альбумины и глобулины (Крылов, 2007). Использование метода электрофореза белка позволило вывести диагностику на качественно новый уровень. Чаще всего именно альбумины являются наибольшей белковой молекулой из всех фракций. Основная цель фракций альбумина — поддержание коллоидного осмотического давления. Исходя из этого, можно объяснить патогенез таких патологических состояний человека, как отеки, асцит, легочные отеки и т.д.

Глобулины подразделяются на следующие группы — альфа — 1, альфа — 2, бета 1 и бета 2, гамма — глобулины.

Составляющие компоненты всех фракций белков — глобулинов:

- альфа — 1 — содержат часть альфа — 1 анти — трипсина и тироксинсвязывающего глобулина;
- альфа — 2 — содержит компоненты гаптоглобина, церулоплазмينا, HDL — и альфа — 2 — макроглобулина;
- Бета часть содержит компоненты трансферрина, комплемента и бета — липопротеидов;
- Гамма часть содержит отличные виды антител — иммуноглобулины M, G,
- альфа — 2 глобулин — 0,6 — 1,0 г/дл;
- бета — глобулин 0,7 — 1,2 г/дл;
- гамма — глобулин 0, 7 — 1, 6 г/дл;
- в общем — 6,4 — 8,3 г/дл.

Изменения, которые может обнаружить расшифровка:

- изменение структуры белковой молекулы;
- изменение количественного соотношения компонентов в молекуле белка [37].

На электрофореграмме, после окрашивания и отмывки геля, было получено разделение белков вышеупомянутых образцов. Так, на дорожке 1 представлен белковый спектр 20% экстракта пыльцы, состоящий из четырех фракций, на дорожке 2 - 15% экстракт обножки, состоящий из 14 фракций, на дорожке 3 - 50% раствор меда, состоящий из пятнадцати фракций. На дорожку 4, для сравнения, была нанесена сыворотка крови человека, которая имеет относительно постоянный химический состав



Рис. 5. Электрофореграмма белков и пептидов продуктов пчеловодства, идентифицированных в 7,5% ПААГ: 1-20% экстракт пыльцы подсолнечника; 2-20% раствор меда подсолнечника

Для определения расстояния, пройденного белками за время электрофоретического разделения, вычисляли расстояние от линии старта до середины каждой окрашенной белковой зоны. Подвижность белка ( $R_f$ ) рассчитывали по формуле:

$R_f = SL/S_1L_1$ , где  $SL$  - это расстояние, пройденное веществом, , а  $S_1L_1$  -

расстояние пройденное растворителем.  $R_f$  является характерной величиной для каждой белка и постоянен при данных условиях (Урванцева, Грачева, 2005).

Таблица 8. Значение  $R_f$  белково-пептидных зон, обнаруженных в 7,5% ПААГ.

| №                                     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Образец                               |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 1. 20% экстракт пыльцы (230,8 мкг/мл) | -     | -     | 0,063 | -     | -     | 0,145 | -     | -     | -     |
| 2. 15 % экстракт обножки              | 0,013 | 0,052 | 0,078 | 0,097 | 0,117 | 0,143 | 0,175 | 0,208 | 0,234 |

|                                                         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| (200<br>мкг/мл)                                         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 3. 50%<br>раствор<br>меда (210<br>мкг/мл)               | 0,014 | -     | 0,068 | 0,102 | 0,129 | 0,150 | 0,177 | 0,218 |       |
| 4.<br>Сыворотка<br>крови<br>человека<br>(250<br>мкг/мл) | 0,020 | -     | 0,067 | 0,101 | 0,127 | 0,148 | 0,181 | 0,221 | 0,248 |
| №                                                       | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    |
| Образец                                                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 1. 20%<br>экстракт<br>пыльцы<br>(230,8<br>мкг/мл)       | -     | -     | 0,331 | -     | -     | 0,446 | -     | -     | 0,615 |
| 2. 15 %<br>экстракт<br>обножки<br>(200<br>мкг/мл)       | 0,260 | 0,292 | 0,331 | 0,396 | -     | 0,461 | -     | -     | -     |
| 3. 50%<br>раствор<br>меда (210<br>мкг/мл)               | 0,272 | -     | 0,330 | 0,374 | 0,415 | 0,449 | 0,496 | 0,530 | 0,578 |
| 4.<br>Сыворотка<br>крови<br>человека<br>(250<br>мкг/мл) | -     | 0,302 | 0,335 | -     | 0,429 | -     | -     | -     | -     |

В результате проведения электрофореза в 7,5% ПААГ, были обнаружены белковые зоны, среди которых есть фракции, обладающие схожими значениями относительной электрофоретической подвижности. Среди фракций есть даже такие, которые отличаются по значению всего на несколько единиц: 1-0,013, 0,014, 12-0,330, 0,331. Это свидетельствует об их общности: источником белковой пищи пчелы является пыльца, небольшая часть которой попадает как в обножку, так и в мед.

Отличающиеся всего на несколько единиц есть также фракции и между пчелопродуктом и сывороткой крови, а это значит, что есть белки, которые

были распознаны буквально на 100%: 3-0,067, 0,068, 4-0,101, 0,102, 5-0,127, 0,129, 6-0,121, 0,118.

Идентифицировать пептиды в данных условиях не удалось. Было выдвинуто предположение о том, что все таки разделение пептидов в данных условиях происходит, т.к., на некоторых электрофореграмах видны следы, возможно, пептидных зон продуктов пчеловодства, однако после фиксации красителем и последующей отмывки геля пептиды в силу своих низких молекулярных масс вымываются из него.

### **3.5 Метод электрофореза в элективном курсе:**

#### **"Основы выбора профессии"**

Подростковый возраст – время для определения своего места в жизни, своей стартовой площадки, с которой начинается разбег по дорожке профессиональной карьеры. «Все профессии хороши, выбирай на вкус...». Но зачастую в подростковом возрасте люди не знают, чего хотят. А если и знают, то не уверены в том, что их выбор правилен. Важность принятия решения и собственная ответственность за принятое решение заставляют человека постоянно откладывать решение вопроса. С другой стороны, время требует определяться как можно скорей.

Профессиональное самоопределение - событие, которое часто в корне меняет все течение жизни, затрагивая все ее сферы. Любимая работа – важнейшая составляющая жизни. Заниматься в жизни любимым делом – значит, жить в согласии с собой. Люди, нашедшие «свою работу», могут четко осознавать: «Я на своем месте, это верно сделанный выбор». И выбор должен осуществить именно тот, кому дальше жить с этим выбором. То есть, сам подросток.

Практическая значимость этого вопроса для всех участников образовательного процесса возрастает в связи с реализацией "Концепции профильного обучения на старшей ступени общего образования". Переход к профильному обучению предполагает организацию предпрофильной

подготовки, которая включает в себя систему педагогической, психологической, информационной поддержки учащихся основной школы, содействует их самоопределению по завершению основного общего образования.

Предпрофильная подготовка, профильное обучение предусматривают проведение целенаправленной работы с учащимися по их профессиональному самоопределению. Причем важно, чтобы профильное обучение не ограничилось специализированной подготовкой в вузы, а позволило бы «не потерять» часть детей, которые нуждаются в большей степени в подготовке к производительному труду в промышленности, в сельском хозяйстве.

Во многих школах, сейчас введен такой предмет как «Основы выбора профессии». Основной целью данной программы является - формирование у учащихся готовности к осознанному социальному и профессиональному самоопределению. Эта программа предназначена для учащихся 8/9 классов.

"Основы выбора профессии" позволяют учащимся изучить свои возможности и потребности и соотнести их с требованиями, которые предъявляет интересующая их профессия, сделать обоснованный выбор профиля в старшей школе, подготовиться к будущей трудовой профессиональной деятельности и в дальнейшем успешно выстроить профессиональную карьеру, адаптируясь к социальным условиям и требованиям рынка труда.

Данный курс позволяет учащимся осознать многообразие мира профессий, ответственность каждого за построение своего профессионального пути, возможности развития человека в профессиональной деятельности.

Анализируя содержание рабочей программы, мы видим, что за время обучения дети изучают типы профессий. Одним из них является тип "человек - техника". Рассмотрим его. Дитя с ранних лет мечтает связать свою жизнь с нечто интересным и увлекательным, а именно с наукой. Он мечтает работать в научной лаборатории, разгадывать "загадки" мира, работать с серьезным оборудованием. Мечты мечтами, а себя пробовать нужно. На данном этапе

рассмотрения типа "человек-техника" мы можем познакомить обучающихся с очень интересным методом, как электрофорез. Для использования этого метода нужно специальное оборудование

Метод электрофореза, предложенный еще в начале XX века, сейчас широко используют в биологии и медицине для разделения белков в исследовательских и клинических целях. С помощью электрофореза можно разделить на отдельные компоненты белковую смесь, что позволяет установить молекулярную массу белка или его субъединиц, подтвердить чистоту выделенного белка.

Чтобы узнать обо всем подробно для ребят можно устроить экскурсию в любую из лабораторий, например, в больнице или в лабораторию при ВУЗе. Если нет такой возможности, можно показать видеоролик, раскрывающий суть данного метода.

Электрофорезом называют движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

Электрофоретический метод в биохимии – это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле. Результатом проведения электрофореза является электрофореграмма – картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления. Электрофореграмма – отличное наглядное пособие. Она позволяет врачам получить значительную диагностическую информацию белков биологических жидкостей человека (сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость и др.). Например, у здорового человека относительное содержание белковых фракций при определении их в сыворотке крови методом электрофореза на бумаге, следующее: альбумины – 55-65%,  $\alpha_1$ -глобулины – 3-6%,  $\alpha_2$ -глобулины – 7-10%,  $\beta$ -глобулины – 7-12%,  $\gamma$ -глобулины – 13-19%. При многих заболеваниях наблюдается изменение соотношения фракций, тогда как общее количество белка обычно мало изменяется. Выявление этих изменений с помощью метода электрофореза широко используется в

диагностических целях. Некоторые электрофореграммы (зимограммы) позволяют изучать изменения активности белков-ферментов под действием внешних и внутренних факторов как у человека, так и у других организмов. Получаемые данные используются в медицине, биотехнологии, различных отраслях сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Рассказ об этом методе не оставит школьников равнодушными к науке. У обучающихся должен быть шанс попробовать профессии "на своей шкуре", хоть и не в полной мере. Тогда, ребенок точно не ошибется с выбором профессии. И только в этом случае в России, в мире повысится трудовая активность рабочей силы и качество работы, ведь её выполнение будет приносить удовольствие людям, а это означает лишь то, что человек сделал правильный выбор и работает по призванию!

## **ВЫВОДЫ**

1. Проведен сравнительный анализ белков и пептидов методами продуктов пчеловодства (экстракта пыльцы, обножки, меда) методом разделения белков и пептидов осаждением ТХУ и методом электрофореза в 7,5% ПААГ.

2. Определено количественное содержание белков и пептидов в исследуемых пчелопродуктах, оно составило  $\pm 50\%$ .

3. В результате электрофореза исследуемых объектов: меда, обножки и пыльцы оказалось, что есть белковые фракции, имеющие одинаковые значения электрофоретической подвижности, что свидетельствует об их общности.

4. Метод электрофореза с последующей фрагментацией может служить одним из предварительных этапов подготовки фракций белков и пептидов для их дальнейшего разделения, например, методом ВЭЖХ.

Полученные данные позволяют определить состав пыльцы подсолнечника, а также качественные характеристики их состава.

## Список литературы

- 1) Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. — М.: Медицина, 1998. — 705 с.
- 2) Биладш Г.Д. Пчеловодство: Маленькая энциклопедия. — Москва, 1991. — 161 с.
- 3) Гребенников Е.А. Лечение медом, продуктами пчеловодства и мумий. — Минск: Книжный дом, 2007. — 253 с.
- 4) Дарбре А. Практическая химия белка. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
- 5) Иойриш Н.П. Лечебные свойства меда и пчелиного яда. — Медгиз, 1954. — 183 с.
- 6) Иойриш Н.П. Продукты пчеловодства и их использование. — М.: Россельхозиздат, 1976. — 175 с.
- 7) Иойриш Н.П. Пчела и здоровье. — М., 1961. — 97 с.
- 8) Кайяс А. Пыльца - чудо продукт и лечебное средство. — М., 1998. — 75 с.
- 9) Кривцов Н.И., Савин А.П., Сокольский С.С., Полевова С.В., Биладш Н.Г., Докукин Ю.В. Медоносные растения европейской части России и их пыльца. Учебное пособие. — Рязань-Рыбное: ФГОУ ВПО РГТУ, ГНУ НИИП, 2009. — 328 с.: ил.
- 10) Крылов В.Н., Агафонов А.В., Кривцов Н.И., Лебедев В.И., Бурмистрова, Л.А., Ошевенский Л.В., Сокольский С.С. Теория и средства апитерапии. — М., 2007. — 296 с.
- 11) Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки — М.: Мир, 1974. — 956 с.
- 12) Максимов П.П. Пчеловодство: пособие для учащихся. — М.: Просвещение, 2012. — 184 с.
- 13) Младенов С. Мед и медолечение. — София, 1969. — 223 с.
- 14) Молекулярная биология. Структура и функции белков; под ред. Спирина А.С. — М.: Высш. шк., 1996. — 335 с.

- 15) Новиков В.Б. Пчелы, цветы и здоровье. — Ярославль, 2007. — 142 с.
- 16) «Правила ветеринарно-санитарной экспертизы меда при продаже на рынках» (утв. Минсельхозпродом РФ 18.07.1995 N 13-7-2/365) — Минюсте РФ. 31.08.1995. — № 942
- 17) Пересадин Н.А., Дьяченко Т.В. Пчелы и травы для твоего здоровья. — М., 2006. — 145 с.
- 18) Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии — Ростов-на Дону: Феникс, 1999. — 540 с.
- 19) Равич-Щербо М. И., Новиков В. В. Физическая и коллоидная химия — М.: Высш. шк., 1975. — 255 с.
- 20) Скоупс, Р. Методы очистки белка. — М.: Мир, 1985. — 359 с.
- 21) Садков Н.А. Морфология пыльцы и спор современных растений в СССР в связи с методами её практического применения. — М.: МГУ, 1962. — 256 с.
- 22) Соловьев В.Б., Генгин М.Т. Практикум по методам биохимических исследований. — Пенза, 2012. — 34 с.
- 23) Уильямс Б., Уилсон К. Методы практической биохимии. — М.: Мир, 1978. — 268 с.
- 24) Урванцева Г.А., Грачева Е.Л. Биохимия и молекулярная биология: Метод. указания. 2-е изд., перераб. и доп.; Яросл. гос. ун-т. — Ярославль: ЯрГУ, 2005. — 55 с.
- 25) Херольд Э., Вайс К. Новый курс пчеловодства. Основы теоретических и практических знаний. — М.: Астрель, 2007. — 368 с.
- 26) Хисматуллина Н.З. Апитерапия. — Пермь, 2005. — 296 с.  
Хмельницкий Р. А. Физическая и коллоидная химия — М.: Высш. шк., 1988. — 400 с.
- 27) Хорн Х., Лейбольд Г. Лекарства из улья: мёд, пыльца, маточное молочко, пчелиный воск, прополис, пчелиный яд. Перев. с нем. М.Беляева — М.: АСТ: АСТРЕЛЬ, 2006 — 238с.

- 28) Шабаршов И.А. Пчеловодство: учебное пособие для 10-11 классов. — М.: Просвещение, 2005. — 195 с.
- 29) Шапиро Д.К., Бандюкова В.А., Шеметков М.Ф. Пыльца растений - концентрат биологически активных веществ. — Наука и техника, 1985. — 72 с.
- 30) Шеметков М.Ф., Шапиро Д.К., Данусевич И.К. Продукты пчеловодства и здоровье человека. — Минск, 1987. — 105 с.
- 31) Шмидт В.М. Математические методы в ботанике: Учебное пособие. Изд-во Ленингр. Ун-та, 1984. — 288с.
- 32) Энгельс Ф. Анти-Дюринг. — Санкт Петербург: Лань, 2013. — 753 с.
- 33) Якубке Х.-Д., Яшкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. - М., Мир, 1985. URL: [http://www.chem.msu.su/rus/elibrary/jakubke/peptide \(2\).pdf](http://www.chem.msu.su/rus/elibrary/jakubke/peptide%20(2).pdf) (дата обращения: 04.03.2016).
- 34) Baroni MV, Chiabrando GA, Costa C, Wunderlin DA. Assessment of the floral origin of honey by SDS-page immunoblot techniques. J Agric Food Chem, 2002. — V. 50, № 6. — P. 1362-1367.
- 35) Benincasa P., Galieni A., Manetta AC., Pace R., Guiducci M., Pisante M., Staqnari F. Phenolic compounds in grains, spouts and wheatgrass of hulled and non-hulled wheat species. J Sci Food Agric, 2015. — № 6. — P. 1795-1803.
- 36) Liebecq C. IUPAC. Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2nd edition, (the «White Book») Portland Press, 1992. — P. 48.
- 37) McNaught A. D., Wilkinson A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the «Gold Book»). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- 38) URL: <http://fizterapia.ru/albuminyi-i-globulinyi/> (Дата обращения: 4.05.2016)
- 39) URL: [http://www.salkova.ru/Product\\_bee/Pollen/composition.php](http://www.salkova.ru/Product_bee/Pollen/composition.php) (Дата обращения: 7.05.2016)

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ**  
**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение**  
**высшего профессионального образования**

**ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Факультет  
физико-математических  
и естественных наук

Кафедра  
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки  
44.03.01 Педагогическое образование  
Профиль подготовки «Биология»

Утверждаю:  
Зав. кафедрой  
Карп Г.А. Карпова  
« 17 » 11 2015 г.

**Задание**

По ВКР студента Артюшкиной Татьяны Викторовны

Тема работы: «Исследование белков и пептидов в пыльце подсолнечника и  
подсолнечном меде»

Утверждена приказом по Университету от « 30 » 10 2015 г. № 1166/0

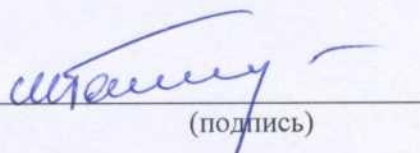
Срок сдачи студентом законченной работы « 23 » 05 2016 г.

# КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

| №п/п | Перечень подлежащих разработке вопросов:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Сроки выполнения этапов                                                                                                                                | Примечания                   |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
|      | Сбор материала исследования: пыльцы подсолнечника.<br>Написание реферата на тему: «Химический состав меда. Белки, ферменты меда».<br>Написание реферата на тему: «Метод электрофореза в ПААГ в изучении белков».<br>Отработка метода определения количественного определения белков и пептидов в меде.<br>Отработка метода экстракции белков и пептидов из пыльцы подсолнечника.<br>Освоение метода электрофореза в ПААГ и проведение исследований по электрофоретическому анализу белков подсолнечного меда и подсолнечной пыльцы.<br>Проведение исследований количественного определения белков и пептидов в подсолнечном меде и подсолнечной пыльце.<br>Проведение исследований по электрофоретическому анализу белков меда и пыльцы.<br>Написание обзора литературы и главы «Материалы и методы исследования».<br>Написание главы: «Результаты исследования и их обсуждение».<br>Оформление ВКР и представление ее в комиссию для защиты. | 20.11.15<br><br>01.12.15<br><br>15.12.15 -<br><br>21.01.16<br><br>12.02.16<br><br>17.02.16<br><br>04.03.16<br>25.03.16<br><br>02.04.16<br><br>20.05.16 | Сборы материала были в июле. |

Дата выдачи задания « 16 » 11 2015г.

Руководитель

  
(подпись)

Задание принял к исполнению

