

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»**

Кафедра химии

Т.В. Макаренко, Е.Л.Зыкова, О.В. Пырх

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ

**Практическое пособие по разделу «Анализ растительного ма-
териала»**

**Практическое пособие для студентов специальности
1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность)**

Гомель 2012

УДК

ББК

?

Рецензенты:

Т.В. Арастович, к.с.-х.н., доцент кафедры физиологии человека и животных

М.С. Лазарева, к.с.-х.н., доцент, заведующая кафедрой лесохозяйственных дисциплин учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Рекомендовано научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины» _____ 2011 г протокол № __.

Т.В. Макаренко, Е.Л. Зыкова, О.В. Пырх

Практическое пособие содержит краткие теоретические сведения, по некоторым органическим компонентам растительных организмов и методам их исследований. Приведенные лабораторные работы могут быть использованы на занятиях по «Большому практикуму», а также для выполнения курсовых и дипломных работ и организации студенческой научно-исследовательской работы / Гомель: Учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», 2012 – 47 с.

УДК

ББК

?

© Т.В. Макаренко, Е.Л. Зыкова, О.В. Пырх

© УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	
Тема 1: Органические кислоты.....	5
Тема 2: Строение и свойства углеводов.....	11
Тема 3: Полисахариды.....	20
Тема 4: Пектиновые вещества.....	24
Тема 5: Аскорбиновая кислота (витамин С).....	30
Тема 6: Танины.....	35
Тема 7: Пигменты.....	37
Тема 8 Ферменты.....	43
Литература.....	46

ВВЕДЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Специфика объектов окружающей среды как объектов химического анализа заставляет подчеркнуть их изменяющийся состав, многокомпонентность и многофазность. Множество протекающих в природной среде химических, биохимических и биогеохимических процессов предопределяет чрезвычайную сложность химико-аналитических исследований. Высокий уровень аналитического контроля объектов окружающей среды является одним из важнейших факторов успешного развития современных технологий. Все это предъявляет высокие требования к специалисту химического профиля. Его участие необходимо в процессе постановки конкретной задачи, при пробоотборе и интерпретации результатов. Таким образом, объективной необходимостью является подготовка студентов-старшекурсников к самостоятельной научно-исследовательской работе.

Лабораторный практикум занимает особое место в подготовке химика-аналитика. Без освоения современных приборов, получения навыков в работе с различными химическими реактивами и посудой невозможна подготовка специалиста высокого уровня.

Задача предлагаемого пособия – оказать существенную помощь студентам как в плане теоретической подготовки по разделу «Анализ растительного материала», так и в плане получения практических навыков – проведения точного аналитического эксперимента и обработке экспериментальных данных. Пособие содержит описание лабораторных работ, которым предшествует краткое изложение теоретических основ, облегчающее выполнение конкретных теоретических задач.

Настоящее практическое пособие рекомендуется к использованию на занятиях по спецкурсу «Большой практикум», а также при выполнении курсовых и дипломных работ и при организации студенческой научно-исследовательской работы.

Тема1: ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Карбоновые кислоты – большая группа органических соединений, широко распространенная в природе. Органические кислоты образуются в процессе дыхания растений и представляют собой продукты неполного окисления сахаров. Вместе с тем они являются исходным строительным материалом для синтеза самых различных соединений.

Содержащиеся в растениях органические кислоты алифатического ряда подразделяются на две большие группы – летучие (перегоняющиеся с водяным паром) и нелетучие. Органические кислоты растений содержатся в них как в свободном виде, как и в виде солей или эфиров. Из летучих кислот наиболее важными являются муравьиная, уксусная и масляная кислоты.

Муравьиная кислота НСООН представляет собой подвижную жидкость с резким запахом. Найдена в крапиве, малине; в виде сложных эфиров содержится в яблоках.

Уксусная кислота $\text{СН}_3\text{СООН}$ встречается в различных плодах и растительных соках. В особенно больших количествах образуется при уксуснокислом брожении как продукт жизнедеятельности уксуснокислых бактерий. Уксусная кислота составляет до 85% всех органических кислот в зерне пшеницы и кукурузы. Содержится в свободном виде и в виде различных сложных эфиров в яблоках.

Уксусная кислота широко применяется в пищевой промышленности при избавлении различных маринадов.

Масляная кислота $\text{СН}_3\text{—СН}_2\text{—СН}_2\text{—СООН}$ встречается в небольших количествах в растениях как в свободном виде, так и в виде сложных эфиров. Свободная масляная кислота обладает сильным и весьма неприятным запахом (запах свежего сливочного масла). Масляная кислота образуется при маслянокислом брожении, применяется в парфюмерной и кондитерской промышленности в виде сложных эфиров, являющихся ценными ароматическими веществами. Например, метиловый эфир масляной кислоты обладает запахом яблок, этиловый – ананасов и т. д.

Гликолевая (оксиуксусная) кислота $\text{НОСН}_2\text{—СООН}$ найдена во многих растениях.

Молочная кислота (α -оксипропионовая) $\text{СН}_3\text{—СН(ОН)—СООН}$ обнаружена во многих растениях. Довольно заметное количество ее содержат листья малины. Молочная кислота часто образуется при анаэробном дыхании растений, особенно в больших количествах – при молочнокислом брожении, вызываемом молочнокислыми бакте-

риями. Молочная кислота применяется в кожевенном деле при обработке кож, как протрава в текстильной промышленности, в медицине. Особенно широко ее применяют в пищевой промышленности при изготовлении конфет, безалкогольных напитков и т. д.

Пировиноградная кислота $\text{CH}_3\text{--CO--COOH}$ – простейшая кетокислота – важнейший промежуточный продукт при диссимиляции углеводов в растении, а также при спиртовом и молочнокислом брожении. Найдена во многих растениях. В ряде растений обнаружена оксипировиноградная кислота $\text{HOCH}_2\text{--CO--COOH}$.

Глиоксилевая (глиоксалева) кислота HOC--COOH – простейшая альдегидокислота. Найдена в различных плодах и проростках, в пшенице, картофеле и других растениях. Играет важную роль в глиоксилатном цикле у многих микроорганизмов, а также в прорастающих семенах масличных растений.

Щавелевая кислота HOOC--COOH – простейшая дикарбоновая кислота. Для нее характерна кальциевая соль, нерастворимая в воде и даже в уксусной кислоте. Чрезвычайно широко распространена в растениях, как в свободном виде, так и в виде солей. Особенно часто содержится в растениях в виде щавелево-кислого кальция, который иногда накапливается в очень больших количествах, в форме сросшихся между собой кристаллов. Большие количества щавелевой кислоты содержат некоторые мясистые растения – суккуленты (молодило и др.). В плодах и ягодах она содержится в незначительном количестве – от 0,005 до 0,06%. Щавелевая кислота может накапливаться в результате развития на сахарных растворах некоторых плесневых грибов.

Малоновая кислота $\text{HOOC--CH}_2\text{--COOH}$ – найдена в листьях фасоли, люцерны и других бобовых растений, в плодах лимона, цветках георгина, а также в зеленых частях растений пшеницы, овса и ячменя. В виде малонилкофермента А является важнейшим промежуточным продуктом при синтезе насыщенных жирных кислот.

Янтарная кислота $\text{HOOC--CH}_2\text{--CH}_2\text{--COOH}$ – образуется в небольшом количестве при спиртовом брожении. Содержится во многих растениях, в частности в ягодах красной смородины, в незрелой вишне, крыжовнике и винограде, а также в черешне и яблоках. Янтарная кислота может накапливаться в результате окисления спирта некоторыми плесневыми грибами. Образуется при дыхании в цикле Кребса.

Щавелевоуксусная кислота $\text{HOOC--CO--CH}_2\text{--COOH}$ – важный промежуточный продукт цикла Кребса, связывающий между собой

превращения углеводов и аминокислот. Играет важную роль в биосинтезе аспарагиновой кислоты, аланина и аспарагина. Найдена во многих растениях.

Альфа-кетоглутаровая кислота $\text{HOOC-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, как и щавелевоуксусная кислота, является важным промежуточным продуктом цикла Кребса; участвует в образовании глутаминовой кислоты и глутамина. Обнаружена во многих растениях.

Яблочная (оксиянтарная) кислота $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH(OH)-COOH}$ – чрезвычайно широко распространена в растениях; преобладает в рябине, барбарисе (до 6%), кизиле, яблоках (вообще в семечковых и косточковых плодах). Она содержится в плодах томатов, семенах злаков и бобовых, а также в листьях. В растениях табака и махорки – до 6,5%. Большие количества яблочной кислоты накапливаются в вегетативных органах сочных растений – суккулентов – молодила, агавы, кактусов. Например, у агавы и молодила эта кислота составляет до 8–10% сухого вещества. Отсутствует в плодах цитрусовых и в клюкве. Яблочная кислота имеет приятный вкус и безвредна для организма человека. Она применяется при изготовлении фруктовых вод и некоторых кондитерских изделий. Образуется в цикле Кребса.

Винная кислота $\text{HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH}$ встречается в растениях в виде оптически активной D-винной кислоты, а также в виде рацемической D-винной, или виноградной, кислоты. Встречается преимущественно в растениях южных широт. В значительном количестве D-винная кислота содержится в винограде вместе с L-яблочной и виноградной кислотами. В других плодах и ягодах D-винная кислота либо содержится в весьма незначительном количестве, либо отсутствует. При изготовлении и выдержке виноградных вин получают значительные количества отходов в виде винного камня (кремортарта), который представляет собой кислую калиевую соль винной кислоты $\text{HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOK}$. Винная кислота и винный камень широко применяются при производстве фруктовых вод, для изготовления химических разрыхлителей теста, в текстильной промышленности при изготовлении протравы и красок, в медицине. В радиопромышленности и при количественном определении сахара применяется сегнетова соль – двойная калий-натриевая соль винной кислоты $\text{KOOC-CH(OH)-CH(OH)-COONa}$.

Фумаровая кислота HOOC-CH=CH-COOH найдена в некоторых растениях (хохлатка и маковые), в лишайниках и во многих грибах. Плесневый гриб *Aspergillus fumigatus* при сбраживании сахара образует до 60–70% фумаровой кислоты – промежуточного продукта цик-

ла Кребса и исходного метаболита биосинтеза аспарагиновой кислоты бактериями.

Лимонная кислота очень широко распространена в растениях. В растениях южных широт ее содержание выше, чем в северных. В ягодах – смородине, малине, землянике – лимонная кислота преобладает над яблочной. В плодах цитрусовых содержится главным образом лимонная кислота (в лимонах до 9% сухой массы). Значительное количество лимонной кислоты содержится в листьях и стеблях махорки – до 7–8% от сухой массы.

Лимонная кислота может быть получена при выращивании некоторых плесневых грибов из родов *Aspergillus* и *Penicillium* на растворах сахаров. В промышленности лимонную кислоту получают биохимическим путем с помощью гриба *Aspergillus niger*. Она широко применяется в пищевой промышленности, а также в качестве консерванта при переливании крови.

Изолимонная кислота содержится в довольно значительных количествах в суккулентах. Например, молодые листья *Bryophyllum calycinum* содержат до 18% изолимонной кислоты (от их сухой массы). В ягодах ежевики изолимонная кислота составляет 2/3 всех органических кислот.

Цис-Аконитовая кислота найдена в заметных количествах в растениях аконита, от которого и получила свое название. Довольно широко распространена в растениях. Лимонная, изолимонная и цис-аконитовая кислоты играют существенную роль в качестве важных метаболитов цикла Кребса.

Кроме упомянутых выше в растениях содержатся и другие кислоты – глюконовая, глюкуроновая, аскорбиновая и др.

Органические кислоты содержатся в растениях в свободном состоянии (в плодах, ягодах и листьях некоторых растений) или в виде кислых и нейтральных солей (в листьях).

Кислотность является одним из основных показателей, характеризующих доброкачественность сырья, полуфабрикатов и готовой продукции. Количество кислот в растении не постоянно и зависит от видовых и сортовых особенностей плодов и овощей, степени зрелости их, свежести, условий хранения и переработки, а также от условий выращивания. Например, при внесении нитратных форм азотных удобрений содержание кислот в растениях будет более высоким, чем при внесении аммиачных удобрений.

Определение количества и состава органических кислот в растениях имеет важное значение. Кислотность не только влияет на вкус про-

дукта, но и показывает направленность и скорость многих бактериологических и химических превращений при его переработке и хранении. Большое значение определений кислотности играет для различных биохимических методов анализа, например, при определении, ферментов, витаминов и др.

Для контроля содержания органических кислот в растительных тканях обычно определяют следующие показатели: общую или титруемую кислотность, и концентрацию водородных ионов или активную кислотность (рН), а в некоторых продуктах содержание летучих кислот. Однако не менее важно определение важнейших органических кислот.

Под общей (титруемой) кислотностью подразумевается содержание в продукте всех кислот и веществ, реагирующих со щёлочью. Не смотря на то, что общая кислотность не отражает в полной мере действительной кислотности продукта, определение этого показателя является ведущим и в практике производственных лабораторий.

При анализах органические кислоты можно экстрагировать из свежемороженых или высушенных растительных тканей. Однако, высушивание при комнатной температуре ведёт к потерям органических кислот вследствие дыхания, а высушивание в условиях повышенной температуры – к изменению в содержании органических кислот (потери летучих кислот или их эфиров, взаимные превращения кислот). Поэтому для определения органических кислот следует быстро фиксировать материал в термостате при 120 – 125⁰С в течение 15 – 20 мин., а затем досушивать при 50 – 60⁰С. Для тонких биохимических исследований материал лучше всего фиксировать жидким азотом с последующим высушиванием лиофилизацией.

Лабораторная работа 1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ (ТИТРУЕМОЙ) КИСЛОТНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Сущность метода

Метод основан на нейтрализации органических кислот 0,1н раствором NaOH в присутствии индикатора фенолфталеина.

Реактивы и оборудование:

- 1 гидроксид натрия NaOH (0,1н р-р);
- 2 1%-ый спиртовой р-р фенолфталеина;
- 3 бюретка;
- 4 пипетки Мора;
- 5 конические колбы.

Ход работы

1 Подготовка образца к анализу:

Для извлечения органических кислот из плодов, ягод и грибов отбирают среднюю пробу свежего продукта и растирают пестиком в фарфоровой ступке. Из полученной кашицеобразной массы в стаканчики на 100 мл отбирают в 2-х-кратной повторности навески по 10 г с точностью до 0,01 г. Если нет возможности быстро провести анализ, во избежание изменений в содержании органических кислот пробу фиксируют и сушат. Анализ ведут в сухом материале. При этом из измельчённой средней пробы отбирают навески по 0,3 г.

2 Проведение определения:

25 мл полученного фильтрата отбирают пипеткой Мора в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 3 капли р-ра фенолфталеина и титруют 0,1н р-ром NaOH до получения слабо-розового окрашивания, не исчезающего, в течение 30 сек. Если фильтрат сильно окрашен, определение титруемой кислотности ведут потенциометрическим методом.

3 Обработка результатов:

Общую (титруемую) кислотность выражают в градусах (кол-ве мл 1н р-ра щёлочи на 100 г или 100 мл исследуемого продукта); в процентах в пересчёте на соответствующую кислоту, преобладающую в данном продукте; в г/л в пересчёте на яблочную кислоту в спиртовых полуфабрикатах и винах. Для ягод титруемую кислотность определяют в пересчёте на лимонную кислоту.

Расчет ведут по формуле:

$$X = \frac{a \cdot T \cdot Y' \cdot K \cdot 100}{n \cdot Y''}$$

где X – общая (титруемая) кислотность;

a – среднее значение объёма 0,1н р-ра NaOH, пошедшего на титрование, мл;

n – навеска исследуемого образца, г (мл);

T – коэффициент пересчёта на точный 0,1н р-р NaOH;

K – коэффициент пересчёта на соответствующую кислоту:

яблочная – 0,0067 лимонная – 0,0064

уксусная – 0,0060 винная – 0,0075

Y' – общий объём полученной вытяжки, мл;

Y'' – объём фильтрата, взятый для титрования, мл;

Расхождение между параллельными результатами не должно превышать 0,02%.

Тема 2: СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА УГЛЕВОДОВ

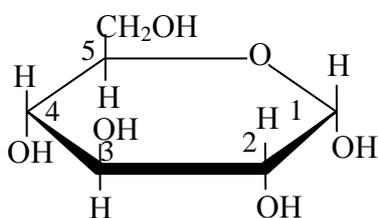
Значение углеводов для растительных и животных организмов исключительно велико. Углеводы – основной питательный и главный опорный материал растительных клеток и тканей. Они составляют до 85–90% всей массы растительного организма. Согласно приблизительным подсчетам ежегодно на Земле образуется более 100 млн. т углеводов в процессе фотосинтеза.

В состав углеводов входят углерод, водород и кислород. Некоторые углеводы, например имеющийся в грибах глюкозамин, содержат также и азот. У большинства углеводов водород и кислород содержатся в том же соотношении, что и в воде (например, глюкоза $C_6H_{12}O_6$ или сахароза $C_{12}H_{22}O_{11}$). Однако некоторые из них (например, сахар рамноза) имеют иное соотношение водорода и кислорода – $C_6H_{12}O_5$.

Все углеводы разделяют на две группы – монозы, или моносахариды, и полиозы, или полисахариды. Несколько молекул моносахаридов, соединяясь между собой с выделением воды, образуют молекулу полисахарида. Две молекулы моноз, соединяясь между собой, образуют молекулу дисахарида с выделением одной молекулы воды. Типичными представителями группы дисахаридов являются сахароза (тростниковый сахар), мальтоза (солодовый сахар) и целлобиоза.

Ди-, три- и тетрасахариды составляют группу полисахаридов (полиоз) первого порядка. Все представители этой группы легко растворимы в воде и в чистом виде являются кристаллическими веществами (олигосахариды). Более сложные углеводы, содержащие в молекуле значительно большее количество остатков простых сахаров, называются полисахаридами (полиозами) второго порядка. Они представляют собой сложные вещества с очень большой молекулярной массой. В воде они либо не растворяются совсем, либо дают вязкие, коллоидные растворы. К числу полисахаридов второго порядка принадлежат слизи, крахмал, гликоген, клетчатка, гемицеллюлозы, пектиновые вещества и др.

D-глюкоза (декстроза, виноградный сахар) сбраживается дрож-

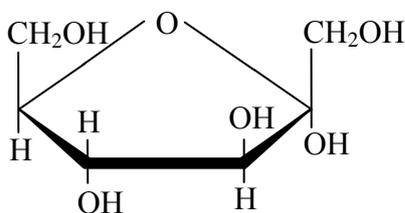


жами. В водных растворах имеет удельное вращение $+52,5^\circ$. Кристаллизуется из воды в виде пластинок, имеющих состав $C_6H_{12}O_6 + H_2O$; из метилового спирта получают безводные кристаллы. Глюкоза изготавливается в больших количествах путем кислотного

гидролиза картофельного или кукурузного крахмала и составляет главную массу патоки, широко применяемой в кондитерском производстве.

В свободном виде содержится в зеленых частях растений, в семенах, различных фруктах и ягодах, в мёде. Входит в состав крахмала, клетчатки, гемицеллюлоз, гликогена, декстринов, сахарозы, мальтозы, рафинозы, многих глюкозидов.

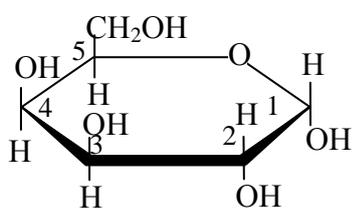
D-фруктоза (левулёза, плодовый сахар) сбраживается дрожжами.



Из воды кристаллизуется в виде иголок, имеющих состав $2 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O}$, из спирта – в виде безводных ромбических призм; удельное вращение водного равновесного раствора $-92,4^\circ$. Фруктоза гораздо слаще других сахаров. Содержится в зеленых частях растений, в нектаре цветов, в плодах, в мёде.

Фруктоза в виде D-фруктофуранозы входит в состав сахарозы, а также многих высокомолекулярных полисахаридов, образующих при гидролизе фруктозу. Эти полисахариды, получившие название полифруктозидов, содержатся и в значительных количествах во многих растениях, особенно из семейства сложноцветных (например, в цикории, земляной груше, коксагызе). Наиболее известным из этих полисахаридов является инулин, накапливающийся в качестве запасного углевода в клубнях земляной груши.

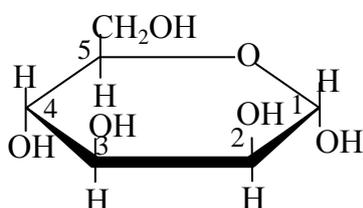
D-галактоза встречается в качестве составной части некоторых



дисахаридов – лактозы (молочного сахара), меллибиозы и содержащегося в растениях трисахарида – рафинозы. Входит в состав многих высокомолекулярных полисахаридов: употребляемого в кондитерской промышленности агар-агара, различных гумми и слизей, а также

гемицеллюлоз. В свободном кристаллическом виде галактоза выделяется на плодах плюща. Галактоза кристаллизуется из воды в виде моногидрата, из спирта – в виде не содержащих воды шестигранных пластинок, плавящихся при 167°C .

D-манноза в растениях встречается в виде составной части раз-



личных высокомолекулярных полисахаридов – слизей и гемицеллюлоз. Маннозу обычно получают путем кислотного гидролиза гемицеллюлоз, образующих скорлупу каменного ореха. Манноза сбраживается дрожжами.

L-сорбоза содержится в сброженном бактериями соке рябины. Образуется при окислении шестиатомного спирта D-сорбита некоторыми бактериями. Сорбоза имеет большое значение в витаминной промышленности, так как является важным промежуточным продуктом при синтезе антицинготного витамина С (аскорбиновой кислоты). Сорбоза имеет температуру плавления 159–161°C.

L-арабиноза широко распространена в растениях в качестве составной части слизей, гумми, пектиновых веществ и гемицеллюлоз. Арабинозу обычно получают путем кислотного гидролиза вишневого клея или свекловичного жома. Хорошо кристаллизуется из спирта в виде призм с температурой плавления +160°C. Не сбраживается дрожжами.

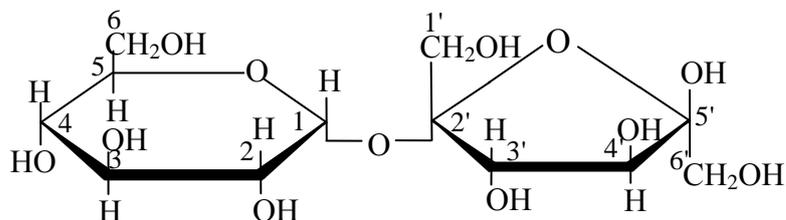
D-ксилоза (древесный сахар) входит в состав многих растительных слизей, гумми и гемицеллюлоз. Получается при кислотном гидролизе отрубей, соломы, древесины, хлопковой шелухи. Для кондитерской промышленности ксилозу получают в довольно значительных количествах путем кислотного гидролиза кукурузных кочерыжек, дающих ее около 12%. Обычными дрожжами ксилоза не сбраживается. Кристаллизуется из воды в виде призм с температурой плавления 143° С. На растворах ксилозы, получаемых путем кислотного гидролиза древесины, соломы или кукурузных початков, очень хорошо растут и развиваются дрожжеподобные организмы *Torula* и *Monilia*, дающие весьма ценный, богатый белком и витаминами корм для скота.

D-рибоза. Температура плавления D-рибозы равна 87° С. D-рибоза и D-2-дезоксирибоза входят в состав нуклеиновых кислот. Производное рибозы – спирт *рибит* входит в состав некоторых витаминов и ферментов. Именно поэтому рибоза и дезоксирибоза представляют чрезвычайный интерес для биохимиков и биологов. Рибоза и фруктоза являются моносахаридами, содержащимися в природных соединениях в фуранозной форме.

Дисахариды. Дисахариды построены, из соединенных между собой остатков двух молекул моносахаридов. При этом могут соединяться две гексозы, две пентозы или же гексоза и пентоза. Дисахариды представляют собой гликозиды, так как соединение двух молекул моносахаридов происходит за счет гликозидного гидроксила одного моносахарида и одной из гидроксильных групп другого моносахарида: в результате выделяется одна молекула воды и образуется молекула дисахарида. При нагревании с кислотами или под действием соответствующих ферментов происходит гидролиз дисахаридов – распад их на две молекулы моносахаридов.

Многие свойства моносахаридов, в частности способность к восстановлению Фелинговой жидкости, зависят от наличия в их молекуле гликозидного гидроксила. Поэтому если при образовании дисахарида моносахариды соединяются за счет обоих своих гликозидных гидроксильных групп, то образовавшийся дисахарид не будет восстанавливать Фелингову жидкость. К таким дисахаридам относятся трегалоза и сахароза. Если же моносахариды соединены в молекуле дисахарида таким образом, что гликозидный гидроксил одного из моносахаридов остается свободным, то такой дисахарид восстанавливает фелингову жидкость. К таким дисахаридам относятся мальтоза, лактоза и целлобиоза.

Сахароза (тростниковый сахар, свекловичный сахар) $C_{12}H_{22}O_{11}$. Чрезвычайно широко распространена в растениях (в листьях, стеблях, семенах, фруктах, ягодах, корнях, клубнях). Играет огромную роль в питании человека. Очень легко растворима в воде. Кристаллизуется в виде больших моноклинических кристаллов. Удельное вращение водных растворов $+66,5^\circ$. Не восстанавливает Фелингову жидкость. Сбраживается дрожжами. Структурная формула сахарозы имеет следующий вид:



Таким образом, молекула сахарозы представляет собой сочетание α -глюкопиранозы и β -фруктофуранозы, соединенных за счет своих гликозидных гидроксильных групп.

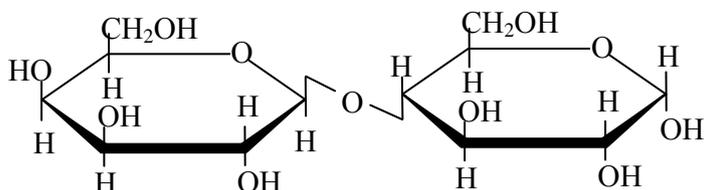
Сахароза не содержит свободного гликозидного гидроксила и поэтому не обнаруживает мутаротации. При нагревании с кислотами или под действием фермента сахаразы (иначе инвертазы) сахароза гидролизуется, образуя инвертный сахар (смесь глюкозы и фруктозы). Название инвертный сахар происходит от слова «инверсия», что значит изменение какой-либо величины на обратную. Гидролиз сахарозы изменяет удельное вращение раствора с правого на левое, так как образующаяся при гидролизе фруктоза имеет значительно большее левое вращение, чем правое вращение образующейся глюкозы. Именно поэтому гидролиз сахарозы называют иначе инверсией.

Характерная особенность сахарозы – исключительная легкость ее гидролиза в кислом растворе – скорость здесь приблизительно в тысячу раз больше, чем скорость гидролиза при этих же условиях таких

дисахаридов, как мальтоза или лактоза.

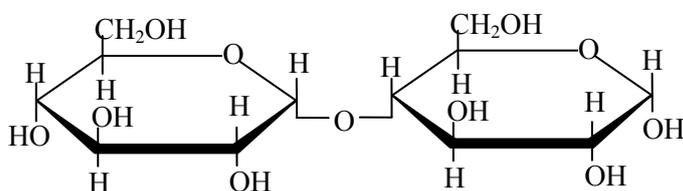
Главные источники получения сахарозы в пищевой промышленности – сахарная свекла и сахарный тростник.

Лактоза (молочный сахар). Содержится в молоке животных. Найдена в пыльцевых трубках некоторых растений. Сбраживается лишь особыми, лактозными дрожжами, содержащимися в кефире и кумысе. В молекуле лактозы имеется один свободный гликозидный гидроксил в остатке глюкопиранозы:



Лактоза восстанавливает Фелингову жидкость и в водных растворах обнаруживает мутаротацию. Вращает плоскость поляризованного света вправо. При гидролизе дает галактозу и глюкозу, являясь (3-галактозидоглюкозой. На сыродельных заводах из сыворотки (отходы производства) получают значительные количества кристаллической лактозы, используемой в пенициллиновой промышленности для приготовления питательных сред и в фармацевтике.

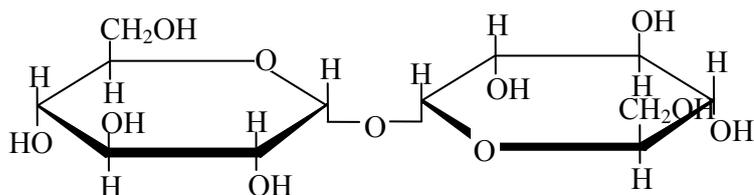
Мальтоза (солодовый сахар). Образуется при расщеплении (гидролизе) крахмала под действием фермента амилазы. Содержится в большом количестве в солоде и солодовых экстрактах. Так как в молекуле мальтозы имеется один свободный гликозидный гидроксил, она восстанавливает Фелингову жидкость и обнаруживает в водных растворах мутаротацию:



В молекуле мальтозы остаток глюкозы, потерявший свой гликозидный гидроксил, является α -глюкозой. Поэтому мальтоза представляет собой α -глюкозидоглюкозу. Удельное вращение мальтозы в водных растворах $+130,4^\circ$. Сбраживается дрожжами в присутствии глюкозы. Под действием фермента мальтазы гидролизует с образованием двух молекул глюкозы.

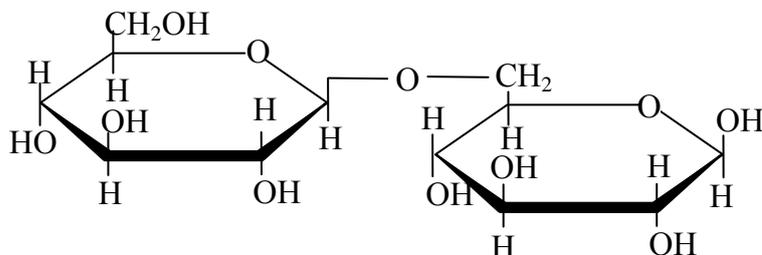
Трегалоза (грибной сахар). Содержится в грибах, в рожках спорыньи, водорослях, в некоторых высших растениях. В пекарских дрожжах содержание трегалозы достигает 18% на сухое вещество. Сбраживается большинством дрожжей. Не содержит свободного гли-

козидного гидроксила и поэтому не восстанавливает Фелингову жидкость.



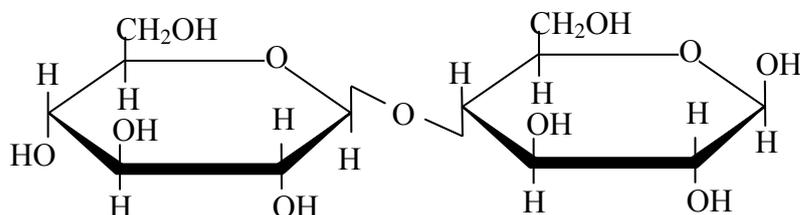
Вращение водных растворов $+178,3^\circ$. При гидролизе дает две молекулы глюкозы.

Гентиобиоза. Дисахарид, входящий в состав многих гликозидов, из которых наиболее важными являются амигдалин и кроцин. В связанном виде гентиобиоза содержится в корнях различных видов горечавки, от которой и получила свое название. При гидролизе гентиобиоза образует две молекулы D-глюкозы. В молекуле гентиобиозы остатки глюкозы связаны за счет гликозидного гидроксила одной молекулы глюкозы и гидроксила, находящегося у 6-го углеродного атома другой молекулы глюкозы. Гентиобиоза представляет собой 6-глюкозо- β -D-глюкопиранозид:



Поскольку гентиобиоза содержит свободный гликозидный гидроксил, она восстанавливает Фелингову жидкость и в растворах обнаруживает мутаротацию.

Целлобиоза. Является основной строительной единицей клетчатки (целлюлозы). В свободном виде содержится в соке (пасоке) некоторых деревьев. Поскольку в молекуле целлобиозы имеется свободный гликозидный гидроксил, она восстанавливает Фелингову жидкость и в водных растворах обнаруживает мутаротацию. От мальтозы отличается наличием β -1,4-глюкозидной связи. Таким образом, целлобиоза представляет собой β -глюкозидоглюкозу:



Сладкий вкус – важнейшее свойство сахаров и их производных, различающихся между собой по этому признаку. Необходимо, однако, отметить, что сладкий вкус свойствен многим другим веществам, ничего общего не имеющим по химической природе с сахарами (например, сахарин). Сравнительные данные о сладости различных сахаров и их производных таковы:

Сахароза 100;	Ксилоза 40;
Фруктоза.173;	Мальтоза32;
Инвертный сахар 130;	Рамноза 32;
Глюкоза 74;	Сорбит 48;
Раффиноза 23;	Глицерин 48;
Лактоза 16;	Галактоза 32.

Овощи содержат мало крахмала. Однако количество растворимых сахаров в них может достигать заметных величин. Содержание в них сахаров должно приниматься во внимание при оценке их пищевого достоинства.

Соотношение между дисахаридами (среди них первое место принадлежит сахарозе) и моносахаридами (глюкоза, фруктоза) колеблется в широких пределах для различных овощных культур.

Сахара расходуются при хранении овощей на дыхание клеток. Поэтому естественно, что зимой и весной этих веществ в овощах будет гораздо меньше, чем осенью, в период уборки. Кроме того, микроорганизмы, поселяющиеся на овощах во время хранения, также усиленно потребляют сахар.

Лабораторная работа 2 КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕДУЦИРУЮЩИХ САХАРОВ

Сущность метода

Предлагаемая методика основана на восстановлении редуцирующими сахарами раствора феррицианида $K_3[Fe(CN)_6]$ в условиях щелочной среды при нагревании в ферроцианида $K_4[Fe(CN)_6]$. Учет сахара ведется по желтой кровавой соли.

Реактивы и оборудование:

- 1 сульфат цинка;
- 2 гидроксид натрия 5%-ый и 1%-ый раствор;
- 3 щелочной раствор красной кровавой соли;
- 4 хлорид меди 0,2%-ый раствор;
- 5 0,1н раствор щавелевой кислоты;
- 6 глюкоза обезвоженная;

- 7 карбонат натрия безводный;
- 8 весы торсионные;
- 9 водяная баня;
- 10 посуда химическая: калиброванные пробирки на 10мл и 25мл, стеклянные палочки, пипетки;
- 11 ФЭК-56М, кюветы на 10мл.

Ход работы

На торсионных весах отвешивают 100-200 мг воздушно сухого, хорошо измельченного материала и помещают в калиброванную на 25 мл пробирку. Заливают его до 3/4 объема горячей дистиллированной водой и нагревают в течение часа на водяной бане при 75-80°C. Во время дигестии содержимое в пробирке 2-3 раза перемешивают стеклянными палочками. *Далее осаждают белковые вещества, для этого в пробирку с анализируемым веществом прибавляют 2 мл свежеприготовленного 5% сернокислого цинка и хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Сюда же по каплям добавляют 0,5 мл 5%-го едкого натрия. Хорошо перемешивают и дают жидкости отстояться. При наступлении нейтральной реакции верхний слой жидкости становится прозрачным. Необходимо контролировать отсутствие ионов цинка. Полноту его осаждения проверяют прибавлением по каплям 1%-го едкого натрия. Если от первой капли появилась белая муть, то добавляют 2-ю, 3-ю и так до тех пор, пока муть не будет появляться.

После осаждения белковых веществ содержимое пробирок доводят водой до метки, хорошо перемешивают и фильтруют через бумажные фильтры. Промывать фильтры или ждать, пока вся вытяжка отфильтруется, не надо, так как объем ее уже определен и перемешиванием было достигнуто равномерное распределение сахара во всем объеме.

Определенное количество фильтрата (0,1–0,5 мл в зависимости от сахаристости анализируемого объекта) помещают в пробирку, калиброванную на 10 мл, добавляют 1 мл щелочного раствора красной кровяной соли и погружают в кипящую воду на 15 минут. Далее пробирки охлаждают, погружая их в холодную воду, прибавляют 1 мл 0,2 % раствора хлорида меди (II), 2 мл 0,1н раствора щавелевой кислоты, доводят водой до метки (до объема 10 мл), энергично встряхивают и через 5 минут можно приступать к колориметрированию. Измерения ведутся при синем светофильтре №3, в кюветах на 10 мм. Количество моносахаридов испытуемого раствора устанавливают по интенсивности окраски путем сравнения ее с контрольным (нулевым) раствором. Контрольный раствор готовят аналогично испытуемому, используя

вместо фильтрата дистиллированную воду.

Концентрацию сахаров в испытуемом растворе находят по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой

В мерной колбе на 500 мл растворяют 500 мг чистой, предварительно обезвоженной глюкозы. При этом концентрация глюкозы составит 0,1 мг на 1 мл раствора. Из этого раствора готовят серию рабочих растворов. Для этого берут 11 пробирок, калиброванных на 10 мл, нумеруют их и, начиная с пробирки №1, вносят приготовленный раствор глюкозы в такой последовательности:

№ пробирки	Взято раствора, мл	Прилито воды, мл	Содержание моносахаридов в мг в 1 мл окрашенного раствора
1	0,05		0,0005
2	0,1		0,001
3	0,2		0,002
4	0,3		0,003
5	0,4		0,004
6	0,5		0,005
7	0,6		0,006
8	0,7		0,007
9	0,8		0,008
10	0,9		0,009
11	1,0		0,01

Анализ и определение глюкозы в стандартных рабочих растворах производится также, как и в испытуемых (начиная со *). По полученным данным строят калибровочную кривую. На миллиметровой бумаге на оси абсцисс откладывают концентрацию сахара, на оси ординат – оптическую плотность по показаниям на ФЭЖе. Линия, соединяющая точки пересечения соответствующих значений концентраций глюкозы и оптической плотности, есть прямая, так как оптическая плотность окрашенных растворов подчиняется закону Бугера-Бера.

С помощью графика, зная величину оптической плотности испытуемого раствора, легко найти концентрацию моносахаридов в испытуемом растворе.

Вышеуказанным методом можно определить и концентрацию сахарозы, предварительно произведя инверсию. Инверсия сахарозы производится при 70°C 5 минут при концентрации соляной кислоты в инвертируемом растворе 2%.

ТЕМА 3: ПОЛИСАХАРИДЫ

Большая часть углеводов, входящих в группу полисахаридов, представляет собой вещества с большим молекулярным весом, дающие коллоидные растворы.

Высокомолекулярные углеводы чрезвычайно важны в обмене веществ у растений и животных, в питании животных и человека, в ряде отраслей промышленности.

Так, крахмал является запасным углеводом растений, составляющим большую часть веществ, входящих в состав многих важнейших пищевых продуктов: муки, хлеба, картофеля и круп.

Клетчатка является веществом, не усваиваемым желудочно-кишечным трактом человека. Вместе с тем она имеет огромное промышленное значение, поскольку из клетчатки состоят хлопок, бумага, льняные ткани и она используется для изготовления искусственного шелка (вискозы) и взрывчатых веществ.

Крахмал не является химически индивидуальным веществом. В растениях он находится в виде крахмальных зерен, различающихся по своим свойствам и химическому составу как в одном и том же растении, так особенно в различных растениях.

Крахмальные зерна имеют овальную, сферическую или неправильную форму. Размеры (диаметр) крахмальных зерен колеблются в пределах от 0,002 до 0,15 мм. Наиболее крупные крахмальные зерна у картофеля, а самые мелкие – у риса и гречихи.

Чрезвычайно характерным свойством крахмала является его способность окрашиваться в синий цвет при добавлении раствора йода в водном растворе йодистого калия. Пользуясь этим реактивом, можно обнаружить очень малые количества крахмала. Появление синего цвета при добавлении йода объясняется образованием химических и адсорбционных соединений между йодом и крахмалом. В холодной воде крахмальные зерна только лишь набухают, но не растворяются. Если взвесить крахмальных зерен в воде постепенно нагревать, то они набухают все сильнее и, наконец, будет достигнута температура, при которой крахмал образует чрезвычайно вязкий коллоидный раствор, называемый крахмальным клейстером. Температура, при которой происходит это изменение крахмала, называется температурой клейстеризации.

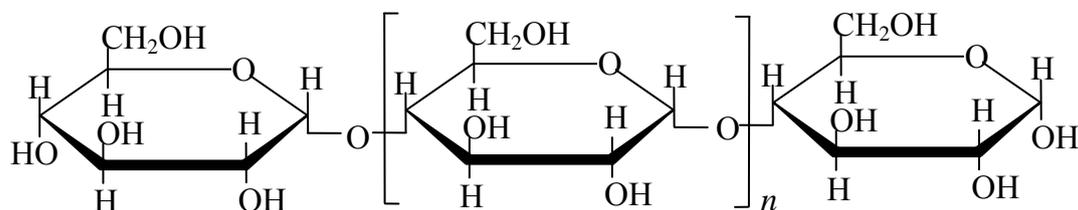
Крахмал на 96,1–97,6% состоит из полисахаридов, образующих при кислотном гидролизе глюкозу. Довольно заметно в крахмале содержание минеральных веществ – от 0,2% до 0,7%. Минеральные ве-

щества представлены главным образом фосфорной кислотой. В крахмале найдены некоторые высокомолекулярные жирные кислоты – пальмитиновая, стеариновая и другие, содержание которых достигает 0,6%.

Углеводная часть крахмала состоит из двух полисахаридов, различающихся по своим физическим и химическим свойствам, – амилозы и амилопектина.

Амилоза легко растворяется в теплой воде и дает растворы со сравнительно невысокой вязкостью. Амилопектин растворяется в воде лишь при нагревании под давлением и дает очень вязкие растворы. Амилоза имеет молекулярный вес в пределах $3 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$, в то время как молекулярный вес амилопектина достигает сотен миллионов. Растворы амилозы весьма нестойки, и при стоянии из них выделяются кристаллические осадки. Амилопектин, наоборот, дает чрезвычайно стойкие растворы.

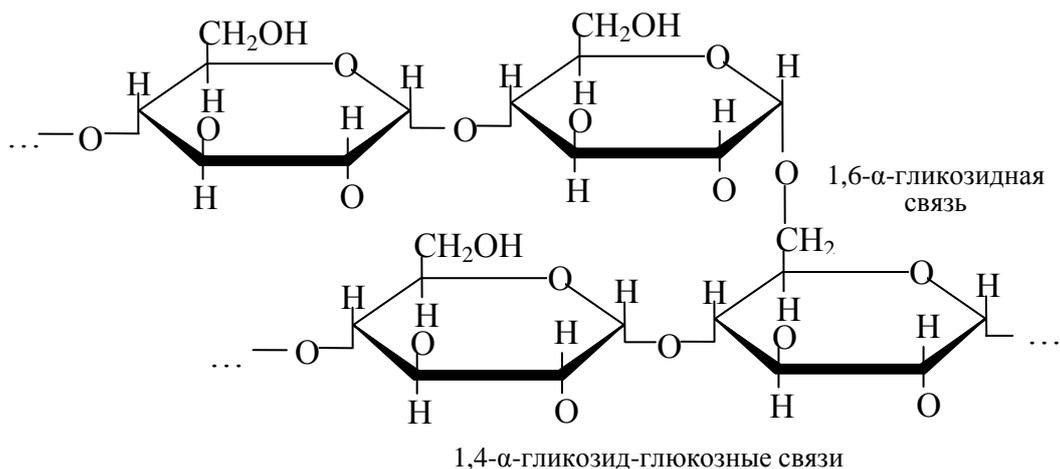
В молекуле амилозы остатки глюкозы связаны гликозидными связями между 1-м и 4-м углеродными атомами; таким образом, они образуют длинную цепочку, как это показано ниже:



Исследования, проведенные с помощью рентгеноструктурного анализа, показали, что в молекуле амилозы соединены несколько таких параллельно расположенных цепочек. В каждой из цепочек глюкозные остатки расположены по спирали.

Амилоза окрашивается раствором йода в синий цвет, а амилопектин – в красно-фиолетовый. Окрашивание амилозы йодом сопровождается образованием комплексного химического соединения. При этом молекулы йода располагаются внутри спирально изогнутых цепочек амилозы. Что касается амилопектина, то его окрашивание от йода является результатом образования адсорбционных соединений.

В молекуле амилопектина глюкозные остатки соединены гликозидными связями только между 1-м и 4-м углеродными атомами, но также между 1-м и 6-м. Таким образом, они образуют разветвленную структуру, схема которой такова:



Необходимо отметить, что содержание амилозы и амилопектина в крахмале может изменяться в зависимости от сорта растения и от того, из какой части растения он получен. Так, например, по составу различаются крахмалы круглых и мозговых горохов, крахмал из листьев и клубней картофеля или же крахмал из зерна различных сортов кукурузы. Если содержание амилозы в крахмале из клубней картофеля составляет 22%, то в крахмале из молодых побегов картофеля оно равно 46%. Если в крахмале из зерна обычной кукурузы содержится 22% амилозы, то в крахмале восковидной кукурузы (*Zea mays ceratina*) амилоза отсутствует полностью, вследствие чего крахмал из зерен этого растения окрашивается йодом в красно-коричневый цвет. С другой стороны, выведены сорта кукурузы, крахмал которых содержит до 82% амилозы.

При кипячении с кислотами крахмал превращается в глюкозу. При более слабом воздействии кислот (например, 7,5% HCl в течение семи дней при комнатной температуре) образуется «растворимый крахмал», часто применяемый в лабораториях.

Под действием фермента амилазы, содержащегося в особенно большом количестве в проросшем зерне, в слюне и в соке, выделяемом поджелудочной железой, происходит ферментативное осахаривание крахмала – он расщепляется с образованием в конечном счете мальтозы.

Лабораторная работа 3 ОБЪЕМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРАХМАЛА (ПО Х. ПОЧИНКУ)

Сущность метода

Метод основан на образовании устойчивого соединения крахмала с йодом, окисляющегося в последствии раствором дихромата калия. Содержание крахмала определяют по разности объемов тиосульфата

натрия, пошедшего на титрование дихромата калия до взаимодействия с йодкрахмальным комплексом и после.

Реактивы и оборудование:

1 0,25н раствор $K_2Cr_2O_7$ (Навеску 12,3 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 250 мл H_2O в колбе на 2 л и постепенно, при охлаждении, прибавляют 800 мл конц. H_2SO_4 , после перемешивания и охлаждения переливают в склянку с притертой пробкой);

2 5%-й и 20%-й $Ca(NO_3)_2$;

3 0,5%-й раствор йода (10 г KI и I_2 растирают в ступке сначала в сухом виде, затем с 10 мл воды, переносят в мерную колбу и доводят до 1 л);

4 0,1н раствор гипосульфита натрия $Na_2S_2O_3$;

5 20%-й раствор KI ;

6 0,5%-й раствор крахмала.

Ход работы

Навеску исследуемого материала, содержащую от 20 до 200 мг крахмала (3 г листьев, 0,25 г зерна, 1 – 5 г клубней картофеля) растирают в ступке с 5 мл 5%-го раствора нитрата кальция, переносят в коническую колбу на 200 мл, смывают 25 мл 5%-го раствора $Ca(NO_3)_2$, колбу накрывают стеклянной воронкой, ставят на плитку и кипятят (не сильно) 3 минуты. При этом крахмал переходит в раствор. После охлаждения воронку смывают водой. Содержимое колбы переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. Набирают пипеткой 5 мл фильтрата (при анализе листьев – 10 мл) в центрифужную пробирку, прибавляют 2 мл раствора йода, перемешивают стеклянной палочкой, ополаскивают ее несколькими каплями воды и оставляют на 30 минут. При этом осаждается соединение крахмала с йодом, содержащее 14 – 16 % йода. Через 30 минут центрифугируют, прозрачный раствор сливают, осадок промывают 5%-м раствором $Ca(NO_3)_2$ несколько раз, каждый раз прибавляют 5 мл и перемешивают осадок с раствором. Промывание повторяют 3 – 6 раз в зависимости от количества примесей (обычно листья необходимо промывать большее число раз). Промытый осадок крахмала с йодом сливают в коническую колбу емкостью 200 мл небольшими порциями воды (по 0,2 – 0,3 мл), хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Общее количество воды не должно превышать 3 мл. В колбу приливают 10 мл 0,25 н раствора $K_2Cr_2O_7$, приготовленную на 85%-й серной кислоте, перемешивают и сейчас же помещают на 15 минут в кипящую водяную баню. При

этом крахмал окисляется бихроматом до углекислоты и воды:



Затем колбу снимают, дают остыть, прибавляют 5 мл 20%-го раствора йодистого калия, который, реагируя с избытком бихромата, выделяет йод. Йод оттитровывают 0,1н раствором гипосульфита натрия, под конец добавляя в качестве индикатора 1 мл 0,5%-го раствора крахмала; 1 мл 0,1н раствора гипосульфита натрия соответствует 0,675 мг крахмала (йод, адсорбированный крахмалом, практически не сказывается на результатах определения).

Отдельно титруют 10 мл 0,25н раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ после разбавления его 120 мл воды и прибавления 5 мл 20%-го раствора йодистого калия (до бледно-голубого окрашивания). Из полученных данных вычисляется содержание крахмала в процентах (X) по формуле:

$$X = \frac{0,675 \cdot b \cdot (a_2 - a_1)}{b_1 \cdot h} \cdot 100\%$$

где a_2 – количество гипосульфита натрия, затраченного при контрольном титровании бихромата калия;

a_1 – количество (в мл) раствора гипосульфита натрия, затраченного при определении крахмала;

b – объем исследуемого раствора (в мл), в котором растворена навеска исследуемого вещества;

b_1 – объем (в мл) исследуемого раствора, взятого для осаждения крахмала;

0,675 – титр раствора крахмала по гипосульфиту;

h – навеска растительного материала (мг).

Тема 4: ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА

Пектиновые вещества представляют собой высокомолекулярные соединения углеводной природы, содержащиеся в большом количестве в ягодах, фруктах, клубнях и стеблях растений. В растениях пектиновые вещества присутствуют в виде нерастворимого протопектина в соединении с арабаном клеточной стенки. Протопектин переходит в растворимый пектин лишь после обработки разбавленными кислотами или под действием особого фермента протопектиназы. Из водного раствора растворимый пектин осаждается спиртом или 50%-ным ацетоном. Характерным и важным свойством пектина является его способность давать студни в присутствии кислоты и сахара. Это

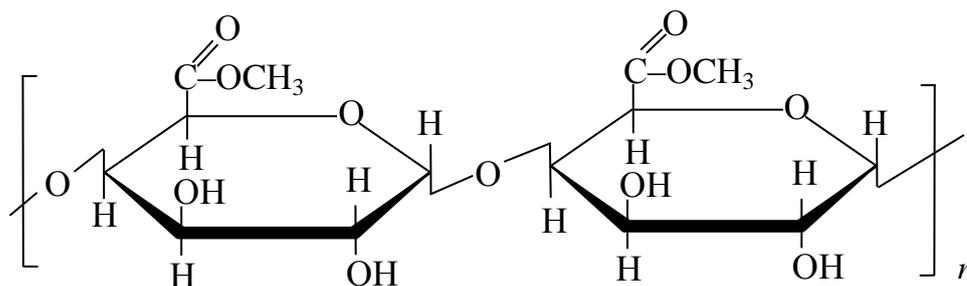
свойство широко используется в кондитерской промышленности при производстве желе, джема, мармелада, пастилы и фруктовых карамельных начинок.

Образование пектинового студня происходит в присутствии 65–70% сахара (сахарозы или гексозы); эта концентрация приблизительно соответствует насыщенному раствору сахарозы. В образующемся студне содержится от 0,2 до 1,5% пектина. Лучше всего образование пектиновых студней происходит при pH 3,1–3,5.

Пектин, выделенный из растений, в высушенном виде представляет собой порошок от белого до серо-коричневого цвета в зависимости от источника получения и степени очистки. Он не обладает запахом, слизистый при пробе на язык. Пектин растворяется в воде, особенно при нагревании, осаждается спиртом и другими органическими растворителями. При повышении температуры выше 100⁰C пектин разлагается. Быстрое его разложение наступает в присутствии ионов хлора.

Пектиновые растворы оптически активные, правовращающие, удельное вращение постоянно при значении pH от 3,0 до 6,5.

Пектин различного происхождения различается по своей способности к желированию, по содержанию золы, метоксильных групп CH₃O-. Растворимый пектин представляет собой полисахарид, состоящий из соединенных между собой остатков галактуроновой кислоты, присутствующей в нем в виде метилового эфира:



При действии на растворимый пектин разбавленных щелочей или фермента пектазы метоксильные группы легко отщепляются – образуется метиловый спирт и свободная пектиновая кислота, которая представляет собой полигалактуроновую кислоту. Пектиновая кислота легко дает соли – пектаты. В виде пектата кальция она легко осаждается из раствора, что используется для количественного определения пектиновых веществ. Пектиновая кислота в присутствии сахара не способна образовывать студни подобно растворимому пектину. Поэтому при промышленном получении пектина стараются вести процесс таким образом, чтобы по возможности избежать его щелоч-

ного или ферментативного гидролиза, вызывающего снижение желирующей способности пектина.

Содержание метоксильных групп является важным показателем пектиновых веществ. Степень этерификации полигалактуроновой кислоты меняется в широких пределах в зависимости от источника получения и способа извлечения – от полностью лишенной метоксильных групп (пектиновой кислоты) до полностью замещённых всех карбоксильных остатков полигалактуроновой кислоты. Пектины, полученные из различных растений, значительно различаются по степени этерификации. Метоксильное число имеет большое значение для желирующих свойств пектина. Для желеобразующего пектина установлена норма содержания метоксильных групп не ниже 7 %.

Молекулярный вес пектина различен в зависимости от его происхождения. Для пектина из плодов яблок, груш и слив молекулярный вес колеблется от 25000 до 35000; близкие величины найдены для пектина сахарной свеклы (20000 – 25000). Пектин из плодов апельсина имеет молекулярный вес от 40000 до 50000.

Пектиновые вещества играют важную роль при созревании, хранении и промышленной переработке различных плодов и овощей. Во время развития плодов протопектин отлагается в клеточных стенках и может накапливаться в плодах в значительных количествах, как, например, в грушах, яблоках и плодах цитрусовых культур. Созревание плодов характеризуется превращением протопектина в растворимый пектин. Так, у яблок содержание пектиновых веществ достигает максимума приблизительно к периоду уборки плодов.

Поскольку пектиновые вещества представляют собой природные органические соединения, то и содержатся они в различных количествах в плодах, овощах, корнеплодах. Наиболее богаты пектинами свёкла столовая, морковь, перец, тыква, баклажаны, яблоки, айва, вишня, слива, груши, цитрусовые, ягоды. Содержание пектиновых веществ в плодах и овощах характеризуется следующими величинами (в %):

Яблоки.....	0,82–1,29
Абрикосы.....	1,03
Слива.....	0,96–1,14
Черная смородина.....	1,52
Клюква.....	0,5–1,30
Морковь.....	2,5
Сахарная свекла.....	2,5

Пектины широко применяются в различных отраслях народного

хозяйства, особенно в пищевой промышленности, где они используются в качестве загущающих веществ для производства джемов, желе, мармелада; в хлебопечении – для предотвращения черствления хлебобулочных изделий; при производстве соусов и мороженого – в качестве эмульгирующего агента; при консервировании – для предотвращения коррозии оловянных консервных банок и т. д.

Яблочные пектины высоко ценятся производителями кондитерской продукции в мире. Для молочной и консервной промышленности (производство фруктовых соков) используют цитрусовые пектины. Под этим термином понимают различные сорта пектина из плодов цитрусовых. Лучшим качеством обладает пектин из лайма (разновидность лимона), хорош пектин из лимона, удовлетворителен – из грейпфрута и апельсина. Неудовлетворительные характеристики имеет пектин из –мандаринов.

Пектины из жома сахарной свеклы применяют для выработки диетических и фармацевтических продуктов, а также для производства изделий технического назначения.

Пектин из корзинок подсолнечника обладает высокой молекулярной массой и низкой степенью этерификации. Как и пектин из – сахарной свеклы, он содержит определенное количество ацетильных групп. Ныне пектин из корзинок подсолнечника успешно применяют при выпуске высококачественных косметических изделий.

Пектиновые вещества играют также важную роль при обработке растительных волокон, например льна. Процесс мочки льна основан на том, что под действием особых микроорганизмов, выделяющих ферменты, гидролизующие пектиновые вещества, происходит мацерация стеблей льна и отделение волокон друг от друга.

Наилучшим растворителем пектиновых веществ является вода. Растворяются они также в 84 %-ной фосфорной кислоте и жидком аммиаке; в глицерине — набухают. В остальных органических и неорганических растворителях они практически нерастворимы. Растворимость пектина в воде возрастает с увеличением степени этерификации и с уменьшением степени полимеризации. Из двух пектинов с одинаковой длиной цепи легче растворим тот, у которого выше метоксильное число; из двух пектинов одинаковой степени этерификации легче растворим тот, который обладает меньшим молекулярным весом.

Пектины издавна применяются в медицине, как хорошие вспомогательные средства для приготовления лекарств. Они хорошо эмульгируют среду, стабилизируют ее состояние, способны оказывать кро-

воостанавливающее действие. Лекарственные формы, содержащие пектины, стимулируют заживление ран, снижают содержание холестерина в крови, влияют на обмен желчных кислот, снижают токсичность антибиотиков, а также удлиняют сроки их действия.

Лабораторная работа 4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ПЕКТИНОВ

Сущность метода

Сущность метода заключается в выделении растительного материала пектиновых веществ в результате щелочного гидролиза нативных пектинов, осаждении пектиновой кислоты в виде пектата кальция с последующим растворением его в уксусной кислоте и оттитровыванием в растворе ионов кальция по общеизвестному комплексометрическому методу. Данные титрования с использованием нормального титра пектиновой кислоты позволяют рассчитать содержание в анализируемом материале суммы пектинов в пересчете на пектиновую кислоту.

Реактивы и оборудование:

- 1 хлорид кальция, 25 %-ный раствор;
- 2 1,0 %-ный и 0,1 %-ный раствор уксусной кислоты;
- 3 карбонат натрия, 1 %-ный раствор;
- 4 гидроксид натрия, 2 %-ный раствор;
- 5 хромоген черный (эриохром Б), индикатор;
- 6 сульфат магния, 0,02 %-ный раствор;
- 7 трилон Б, 0,1 %-ный раствор;
- 8 аммиачный буфер, рН 10 (11 г хлористого аммония растворяют в 70 мл 25 %-ного раствора аммиака и доводят объем до 200 мл дистиллированной водой);
- 9 посуда мерная: мерные колбы разных емкостей, ступка с пестиком, центрифужные пробирки, стаканчики на 100 мл, стеклянные палочки, конические колбы на 100мл;
- 10 центрифуга, водяная баня.

Ход работы

Приготовление гидролизата

Навеску исследуемого материала (0,2–0,5 г сухого вещества или 1–2 г сырого) тщательно растирают в ступке с 5 мл щелочного раствора соды (2% Na_2CO_3 +0,16% NaOH). Суспензию переносят в центрифужную пробирку емкостью 20 мл, а остаток на пестике и ступке смывают тем же раствором соды, расходуя 10 мл его. Пробирки по-

мешают в кипящую водяную баню и нагревают с периодическим перемешиванием 20 мин. Затем проводят центрифугирование в течение 5–7 мин при 4,5–5,0 тыс.об/мин. Надосадочный раствор (центрифугат) осторожно сливают в стаканчик емкостью 100 мл, а осадок дважды промывают горячей дистиллированной водой порциями по 10 мл, тщательно перемешивая содержимое пробирок. Затем центрифугируют, присоединяя каждую порцию надосадочного промывного раствора к центрифугату в стаканчике.

Осаждение пектиновой кислоты

Осаждение пектиновой кислоты в виде пектата кальция проводят из объединенного центрифугата. В стаканчики с раствором приливают по 1 мл ледяной уксусной кислоты, хорошо перемешивают, добавляют 2 мл 25%-ного раствора CaCl_2 , снова перемешивают и ставят на плитку. Нагревание ведут при помешивании до кипения. Стаканчики снимают с плитки, для удаления углекислоты выдерживают 10 мин периодически перемешивая раствор, затем центрифугируют. Если емкость центрифужной пробирки не позволяет работать с полным объемом раствора, то последний центрифугируют в 2-3 приема, каждый раз осторожно сливая и отбрасывая надосадочную жидкость.

Промывание осадка

Остаток раствора со стенок стаканчика смывают 8 мл 0,1 %-ного раствора CH_3COOH в центрифужную пробирку с осадком пектата кальция и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Палочку обмывают над центрифужной пробиркой 2 мл 0,1 %-ной CH_3COOH . Затем проводят центрифугирование и удаляют промывной раствор. Всю операцию повторяют 4 раза, проводя тем самым промывание осадка пектата кальция.

К промытому осадку приливают 10 мл 1 %-ного раствора Na_2CO_3 и помещают пробирку в кипящую водяную баню на 5 минут, периодически перемешивая ее содержимое. Затем проводят центрифугирование. Надосадочный раствор сливают и отбрасывают, а осадок промывают 1 раз 5-ю мл дистиллированной воды и снова центрифугируют.

Растворение осадка

К осадку приливают по 10 мл 1 %-ного раствора CH_3COOH , пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5 мин с частым перемешиванием содержимого, центрифугируют. Центрифугат сливают в коническую колбу емкостью 100 мл. Осадок промывают 10-ю мл дистиллированной воды, центрифугируют, промывной раствор присоединяют к центрифугату в колбе. Осадок отбрасывают.

Ход определения

В полученном растворе титрованием определяют содержание кальция. В колбу с раствором приливают 5 мл 0,1 %-ный раствора трилона Б, 5 мл аммиачного буфера и на кончике шпателя вносят хромоген черный. Титруют 0,02 %-ным раствором сернокислого магния до перехода окраски от синего в вишне-вокрасный цвет.

Тем же раствором титруют холостую пробу: 5 мл 0,1 %-ный трилона Б + 5 мл аммиачного буфера + индикатор

Обработка результатов

Сумму пектиновых веществ в пересчете на пектиновую кислоту вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{22,1N(a-b)}{n},$$

где X – содержание пектиновой кислоты, %;

N – нормальность титрованного раствора $MgSO_4$;

a – объем 0,02 н раствора $MgSO_4$, пошедшего на титрование холостой пробы, мл;

n – навеска анализируемого материала, г;

22,1 - нормальный титр пектиновой кислоты, умноженный на 100 для пересчета в %;

b – объём 0,02 н раствора $MgSO_4$, пошедшего на титрование исследуемого раствора.

ТЕМА 5: АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА (ВИТАМИН С)

Витамин С был выделен в 1928 г., но связь между заболеваемостью цингой и недостатком витамина была доказана только в 1932г. Витамин С является γ -лактоном, близким по структуре к глюкозе. Его молекула имеет два ассиметрических атома углерода (4C и 5C) и четыре оптических изомера. Биологически активна только L-аскорбиновая кислота. Аскорбиновая кислота образует редокс-пару с дегидроаскорбиновой кислотой, сохраняющей витаминные свойства.

Водные растворы аскорбиновой кислоты быстро окисляются в присутствии кислорода даже при комнатной температуре. Скорость деградации возрастает с повышением температуры, при увеличении рН раствора, под действием УФ-лучей, в присутствии солей тяжёлых металлов. Аскорбиновая кислота разрушается в процессе приготовления пищи и хранения продуктов.

Витамин С занимает доминирующее положение во внеклеточной

антиоксидантной защите, значительно превосходящее в этом отношении глутатион-SH. Он является также важнейшим внутриклеточным антиоксидантом. Антиоксидантная функция аскорбиновой кислоты объясняется её способностью легко отдавать два атома водорода, используемых в реакциях обезвреживания свободных радикалов. В высоких концентрациях этого витамина «гасит» свободные радикалы кислорода. Важной функцией аскорбата является обезвреживание свободного радикала токоферола (витамин E), благодаря чему предупреждается окислительная деструкция этого главного антиоксиданта клеточных мембран. Как антиоксидант аскорбиновая кислота необходима для образования активных форм фолиевой кислоты, защиты железа гемоглобина и оксигемоглобина от окисления, поддержания железа цитохромов P₄₅₀ в восстановленном состоянии.

Витамин C участвует во всасывании железа из кишечника и высвобождении железа из связи его с транспортным белком крови – трансферрином, облегчая поступление этого металла в ткани. Он может включаться в работу дыхательной цепи митохондрий, являясь донором электронов для цитохрома C.

Уже незначительный дефицит витамина C проявляется ощущением усталости, снижением аппетита, подверженностью к простудным заболеваниям. Характерно легкое появление синяков (кровоизлияний) на коже. Кровоточивость десен – уже достаточно позднее проявление гиповитаминоза C. Глубокий дефицит витамина C приводит к заболеванию цингой (скорбутом). Главным проявлением цинги является нарушение проницаемости капилляров, обусловлено недостаточностью гидроксилирования пролина и лизина в коллагене, и нарушение синтеза хондроиндисульфатов. Отсюда и такие клинические проявления гиповитаминоза как кровоточивость десен, расшатывание зубов, отеки и боли в суставах, поражение костей, бледность кожных покровов, нарушением заживления ран. Смерть наступает обычно от кровоизлияния в полость перикарда.

Мышечная слабость цинготного больного является следствием быстро развивающейся недостаточности карнитина, обеспечивающего энергетику миоцитов. При гиповитаминозе развивается железодефицитная анемия из-за нарушения всасывания железа и использования его запасов при синтезе гемоглобина. При недостатке аскорбата снижается также участие фолиевой кислоты в пролиферации костномозговых клеток, что усугубляет симптоматику анемии.

Гиповитаминоз всегда сопровождается ослаблением иммунозащитных сил организма, а также усиления реакции свободнорадикаль-

ного окисления, лежащих в основе патогенеза множества заболеваний – лучевой болезни, рака, атеросклероза, диабета и др. В организме человека, обезьян, морских свинок и некоторых птиц витамин С не синтезируется.

Содержание аскорбиновой кислоты в некоторых продуктах

Наименование продукта	Содержание в продуктах мг/100г	Количество продукта, обеспечивающее сут. потребность (60 – 70мг)
Овощи		
Капуста		
белокочанная свежая	45 – 60	100 – 150 г
отварная	20 – 25	250 – 300 г
тушеная	15 – 20	300 – 500 г
квашеная	10 – 20	300 – 700 г
цветная свежая	70	90 – 100 г
Картофель свежий	20	150 – 200 г
Перец сладкий красный	250	25 – 30 г
Петрушка (зелень)	150	40 – 50 г
Укроп	100	50 – 60 г
Редис, помидоры, зеленый горошек	25	250 – 300 г
Салат, кабачки	15	400 – 500 г
Огурцы, свекла, морковь, баклажан	5 – 10	600 – 1400 г
Фрукты		
Цитрусовые	40 – 65	100 – 150 г
Бананы	20	300 – 400 г
Яблоки свежие	10 – 20	300 – 700 г
Косточковые (вишня, черешня, слива, персик)	10 – 15	400 – 700 г
Инжир	2	3000 – 4000 г
Ягоды		
Шиповник	650	10 г
Облепиха	200	30 – 40 г
Смородина черная	200	30 – 40 г
Земляника садовая	60	100 г
Малина	25	250 – 300 г
Виноград	5	1000 г
Молоко и молочные продукты		
Молоко, кисломолочные продукты, творог, сыр	0,5 – 2,0	3000 – 5000 г
Мясо и мясные продукты		
Печень (говяжья, свиная, птицы)	20 – 30	600 – 700 г
Мясо	следы	

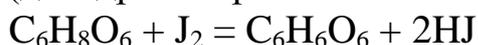
В пищевом рационе аскорбиновая кислота должна присутствовать постоянно, так как она быстро расходуется, а ее избыток уже через 4 часа полностью выводится из организма. Для профилактики цинги следует ежедневно получать 50 мг аскорбиновой кислоты, однако наиболее оптимальной для здорового человека вне стрессовой ситуации является доза 100 – 200 мг в сутки; при заболеваниях она может быть увеличена до двух грамм в сутки.

Лабораторная работа 5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИОДОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ В РАСТЕНИЯХ

Сущность метода

Аскорбиновая кислота $C_6H_8O_6$ обладает сильными восстановительными свойствами. В растительном организме легко осуществляется переход аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и обратная реакция.

Количественное определение аскорбиновой кислоты основано на реакции окисления её йодом. При этом образуется окисленная форма её (дегидроаскорбиновая кислота):



кислотный характер аскорбиновой кислоты обусловлен енольными гидроксогруппами.

Реактивы и оборудование:

- 1 0,1н раствор йода;
- 2 йодид калия;
- 3 2%-ный раствор метафосфорной кислоты;
- 4 раствор йода;
- 5 1%-ный раствор серной кислоты;
- 6 химическая посуда (воронка, мерная колба на 100 мл, конические колбы);
- 7 фарфоровая ступка, пестик;
- 8 микробюретки;
- 9 весы технические.

Ход работы

Приготовление навески

Навеску измельчённого материала (1–3 г для зелёных листьев и 5–10 г для корнеплодов) помещают в фарфоровую ступку. На кончике скальпеля добавляют кварцевый песок и приливают из цилиндра в ступку 20 мл 1%-ной серной кислоты. Содержимое ступки растирают

пестиком до гомогенной массы, растирание длится не более 10 мин. Носик ступки с наружной стороны смазать вазелином. Гомогенат из ступки количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, пользуясь воронкой без фильтра и стеклянной палочкой. Ступку, пестик и палочку многократно споласкивают 2%-ным раствором метафосфорной кислоты, сливая это в ту же колбу, перемешивают содержимое колбы и метафосфорной кислотой доводят до метки. Содержимое колбы оставляют стоять на 10–15 мин для лучшей экстракции аскорбиновой кислоты и осаждения белков. Гомогенат фильтруют через бумажный фильтр в сухую коническую колбочку или стакан на 100 мл. Из фильтрата берут пипеткой две параллельные пробы по 10–20 мл и переносят в конические колбочки на 50–100 мл. Их содержимое титруют из микробюретки. Бюретку заполняют титрованным 0,1н. раствором I_2 .

В колбу для титрования вносят 10 мл анализируемого раствора, затем приливают 2 мл раствора крахмала. Содержимое колбы титруют 0,1н раствором йода до появления слабо-синего окрашивания.

Титрование повторяют 3 раза и по среднему значению объёма V_1 , израсходованного на титрование, рассчитывают нормальность анализируемого раствора аскорбиновой кислоты и массу аскорбиновой кислоты в указанном объёме раствора.

Приготовление стандартного раствора йода

Для приготовления стандартных растворов применяют свежеприготовленный йод. Растворимость йода в воде очень мала: насыщенный раствор содержит около 0,03% йода. Поэтому обычно готовят растворы йода в водном растворе иодида калия.

Для приготовления 1 л приблизительно 0,1н. раствора йода стакан ёмкостью 250 мл помещают 40 г иодида калия и 25 мл воды, прибавляют 12,7г возогнанного йода (навеску йода берут в бюксе и взвешивают на технических весах), перемешивают до полного растворения йода, раствор переливают в склянку и только тогда разбавляют водой до 1 л. Концентрация раствора йода может изменяться в следствии летучести йода. Поэтому растворы необходимо хранить в сосудах с плотно пришлифованными стеклянными пробками. При концентрации иодида калия не менее 4% раствор йода устойчив.

Установка титра стандартного раствора иодида по тиосульфату

Реакция окисления-восстановления между йодом и тиосульфатом при соблюдении определённых условий протекает строго количественного.

Окислительный потенциал системы $J_2 + 2e^- = 2J^-$ равен $E^0 = +0,5345\text{В}$, а окислительный потенциал системы $2S_2O_3^{2-} - 2e^- = S_4O_6^{2-}$ равен $E^0 = +0,15\text{В}$.

При титровании 0,1н. раствором йода рН должен быть больше 7,6; при рН=8 йодометрический метод не приемлем, так как протекает реакция диспропорционирования йода.

Нагревание недопустимо, так как йод очень летуч.

В коническую колбу переносят пипеткой 20–25 мл стандартного раствора тиосульфата натрия, добавляют 1–2 мл раствора крахмала и титруют йодом до появления синей окраски.

Иногда тиосульфат натрия помещают в бюретку, а в коническую колбу пипеткой отбирают раствор йода. В этом случае крахмал прибавляют. Когда раствор приобретает бледно-жёлтую окраску, и титруют до исчезновения синей окраски, появляющейся в результате прибавления крахмала.

Тема 6 ТАНИНЫ

Дубильные вещества, или танины, обладают вяжущим вкусом и способны превращать шкуру животного в дубленую кожу. Издавна для выделки кож применялась кора дуба, отчего эти вещества и получили свое название.

На воздухе эти вещества окисляются, образуя флобафены – продукты, окрашенные в бурый цвет и не обладающие дубящими свойствами. Этим объясняется побурение внутренней стороны коры дуба при сушке, красно-бурая окраска отвара череды и других растений.

Природные танины представляют собой смесь производных глюкозы, связанной с разным числом остатков галловой и дигалловой кислот.

Выделенные из растений дубильные вещества представляют собой аморфные или кристаллические вещества, растворимые в воде и спирте. С солями тяжелых металлов они образуют осадки, а с солями трехвалентного железа – окрашенные соединения. Осаждают слизи, белки, клеящие вещества, алкалоиды, отчего несовместимы с ними в лекарствах. С белками они образуют нерастворимые в воде альбуминаты, на чем основано их применение в медицине (бактерицидное, противовоспалительное действие). Таким свойством не обладают флобафены, поэтому сушку сырья, содержащего дубильные вещества, производят быстро, для сохранения их максимального количества.

Лабораторная работа 6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТАНИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Сущность метода

В основу метода положена реакция окисления танинов марганцево-кислым калием в присутствии индигокармина.

Реактивы и оборудование:

1 кислота серная H_2SO_4 , разбавление 1:4 ($H_2SO_4:H_2O$);

2 индигокармин, раствор в H_2SO_4 . (0,25 г индигокармина растворяют в 12,5 мл концентрированной серной кислоте в мерной колбе емкостью 250 мл. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой);

3 перманганат калия, $KMnO_4$, 0,05 н раствор (титр раствора устанавливают по 0,1 н раствору щавелевой кислоты);

4 химическая посуда (стаканы, конические колбы);

5 бюретка.

Ход работы

Подготовка пробы к анализу

Для извлечения органических кислот из плодов, ягод и грибов отбирают среднюю пробу свежего продукта и растирают пестиком в фарфоровой ступке. Из полученной кашицеобразной массы в стаканчики на 100 мл отбирают в 3-х кратной повторности навески по 10 г с точностью до 0,01 г. Если нет возможности быстро провести анализ, во избежание изменений в содержании органических кислот пробу фиксируют и сушат. Анализ ведут в сухом материале. При этом из измельченной средней пробы отбирают навеску 0,3 г.

В стаканчики с пробами приливают по 60 мл горячей ($70 - 80^{\circ}C$) дистиллированной воды и перемешивают содержимое. Стаканчики ставят на 30 мин в водяную баню при температуре $80 - 90^{\circ}C$, время от времени перемешивая. Горячую вытяжку фильтруют через сухой фильтр “белая лента” в мерные колбы емкостью 250 мл, многократно обмывая стаканчики водой, и охлаждают до комнатной температуры. Фильтрат должен быть прозрачным. Объем фильтрата доводят до метки водой.

Проведение определения

В фарфоровую чашку емкостью 250 мл пипеткой Мора отбирают 20 мл фильтрата, добавляют 230 мл воды, 3 мл раствора индигокармина и 2,5 мл раствора серной кислоты. Смесь титруют 0,05 н раствором

перманганата калия с помощью магнитной мешалки. Следует использовать бюретку на 5 мл.

Титрование ведут со скоростью одной капли в секунду до появления слабо-розового оттенка, хорошо заметного по краям чашки. При этом цвет раствора постепенно изменяется от синего через темно-зеленый, зеленовато-желтый в золотисто-желтый. Повторность определения 3-х кратная. Титрование необходимо проводить при строго одинаковых условиях (температура раствора, скорость титрования) при хорошем освещении.

Для внесения поправки на остальные окисляющиеся составные части исследуемой вытяжки проводят контрольный анализ по каждой пробе, в которой танины удаляют путем адсорбции их активированным углем. В контроле в стаканчик берут также 20 мл исследуемого фильтрата и прибавляют к нему 1,5 г активированного угля в порошке, нагревают 40 мин на водяной бане при помешивании и фильтруют в ту же большую фарфоровую чашку, обмывая стаканчик в несколько приемов 10-ю мл воды. Уголь на фильтре промывают еще 5 мл воды. В чашку приливают 215 мл воды (общий объем раствора должен быть 250 мл), добавляют 3 мл индигокармина и 2,5 мл раствора H_2SO_4 и титруют 0,05 н раствором перманганата. При этом в вытяжке титруются все окисляющиеся вещества, кроме танинов и пигментов.

3 Проведение расчетов

Содержание танинов (x) вычисляют в процентах по формуле:

$$x = \frac{(a-b) \cdot 0,004157 \cdot V \cdot 100}{c \cdot 2V_1}$$

где (a-b) – разность результатов титрования, полученных в первом и во втором (контрольном) опыте, мл 0,05 н раствора $KMnO_4$;

c – навеска исследуемого растительного материала, г;

0,004157 – коэффициент пересчета результата титрования в танины (дубильные вещества), т.е. 1мл 0,1 н перманганата соответствует 0,004157 г танинов;

V – общий объем вытяжки;

V_1 – объем фильтрата, взятого для анализа.

ТЕМА 7: ПИГМЕНТЫ

Пигменты, принадлежащие к группе жирорастворимых, нерастворимы в воде, но растворяются в органических растворителях. К группе каротиноидов относят вещества, окрашенные в желтый или оран-

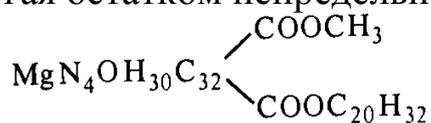
жевый цвет. Наиболее известные представители каротиноидов – каротины – пигменты, придающие специфическую окраску корням моркови, а также лютеин – желтый пигмент, содержащийся наряду с каротинами в зеленых частях растений. Окраска семян желтой кукурузы зависит от присутствующих в них каротинов и каротиноидов, получивших название зеаксантина и криптоксантина. Окраска плодов томата обусловлена каротиноидом ликопином. Каротиноиды играют большую роль в обмене веществ у растений, участвуя в процессе фотосинтеза.

Хлорофиллы – это пигменты, придающие зеленую окраску растениям. Они имеют огромное значение в процессе фотосинтеза.

Хлорофилл – зелёный пигмент растений, с помощью которого они улавливают энергию солнечного света и осуществляют процесс фотосинтеза. Локализован в особых клеточных структурах – хлоропластах или хроматофорах и связан с белками и липидами мембран.

В настоящее время известно около 10 типов хлорофиллов. Они отличаются по химическому строению, окраске, распространению среди живых организмов. У всех высших растений содержатся *хлорофиллы a* и *b*. *Хлорофилл c* содержится в диатомовых водорослях, *хлорофилл d* – в красных водорослях. Кроме того, известны четыре бактериохлорофилла, содержащиеся в клетках фотосинтезирующих бактерий. В клетках зелёных бактерий содержатся *бактериохлорофиллы c* и *d*. В клетках пурпурных бактерий – *бактериохлорофиллы a* и *b*.

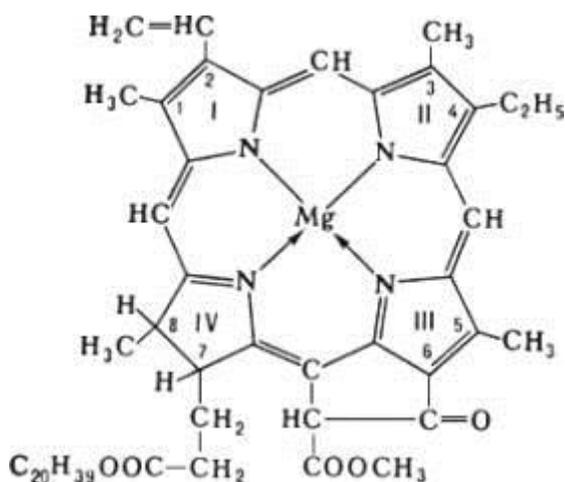
С химической точки зрения хлорофилл представляет собой сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина, у которой одна карбоксилиная группа этерифицирована остатком метилового спирта, а другая остатком непредельного спирта фитола.



Пространственная структура молекулы определяет свойства хлорофилла.

Основой молекулы является плоское порфириновое ядро, образованное четырьмя пиррольными кольцами (I – IV) соединенными между собой метиновыми мостиками.

Такая структура молекулы определяет свойства хлорофилла – гидрофобный фитольный «хвост» надежно удерживает молекулу в гидрофобной части мембраны тилакоида хлоропласта, а гидрофильное порфириновое ядро обращено к строме хлоропласта. При этом само ядро ориентированно параллельно мембране, в которой находится хлорофилл.



Строение молекулы *хлорофилла а*

В твердом виде хлорофилл а представляет собой аморфное вещество сине-черного цвета. Температура плавления хлорофилла а 117 – 120°С. Хлорофиллы хорошо растворимы в этиловом эфире, бензоле, хлороформе, ацетоне, этиловом спирте, плохо растворимы в петролейном эфире и нерастворимы в воде.

Пигменты фотосинтетического аппарата поглощают свет в пределах видимой части спектра (380 – 720 нм), благодаря чему эта область излучения называется фотосинтетически активной радиацией. Поглощение пигментами лучей определенной длины волны обусловлено их молекулярной структурой, наличием в них хромофорных группировок.

Резко выраженные максимумы поглощения хлорофиллов лежат в красной и синей частях спектра. Хлорофиллы очень слабо поглощают оранжевый и желтый свет и совсем не поглощают зеленые и инфракрасные лучи.

Поглощение в сине-фиолетовой части спектра обусловлено системой конъюгированных одинарных и двойных связей порфиринового кольца молекулы хлорофилла. Интенсивная полоса поглощения в красной области связана с гидрированием двойной связи у $C_7 - C_8$ в IV пиррольном ядре (при переходе от протохлорофиллида к хлорофиллиду) и присутствием магния в порфириновом кольце. Эти же условия способствуют снижению поглощения в желтой и зеленой частях спектра.

На положение максимумов спектра поглощения оказывают влияние природа растворителя и взаимодействие молекул хлорофилла друг с другом, а также с другими пигментами, липидами и белками. У

агрегированных молекул хлорофилла (например, в твердых пленках и у хлорофилла, находящегося в хлоропластах) красный максимум поглощения сдвинут в более длинноволновую область (до 680 нм).

Хлорофилл – важнейший компоненты фотосинтетического аппарата листьев. Количество хлорофилла в листьях зависит от жизнедеятельности организма, его генетической природы. Поэтому оно может быть использовано как физиологический показатель, характеризующий онтогенетические, возрастные и генетические особенности растений. Количество пигментов отражает и реакцию растительного организма на условия произрастания.

В хлоропластах и хроматофорах большая часть молекул хлорофилла (содержание его обычно составляет 0,5–1,5% на сухую массу) находится в виде светособирающей «антенны» и меньшая часть – в реакционных центрах, непосредственно участвующих в работе цепи фотосинтетического переноса электрона. Поглощая квант света, молекула хлорофилла переходит в возбуждённое состояние (длительность жизни синглетного возбуждённого состояния около 10^{-9} сек), которое может переходить в долгоживущее триплетное возбуждённое состояние с длительностью жизни до 10^{-3} сек. Возбуждённые светом молекулы хлорофилла способны переносить электрон от молекулы-донора к молекуле-акцептору.

Способность возбуждённого хлорофилла к переносу электрона обеспечивает функционирование реакционных центров фотосистем цепи фотосинтетического переноса электрона. Поглощённый молекулой хлорофилла свет, преобразуется в потенциальную химическую энергию органических продуктов фотосинтеза и молекулярного кислорода. Свет, поглощаемый хлорофиллом, вызывает в клетках также другие фотобиологические явления: индуцирует генерацию электрического потенциала на мембранах хлоропластов, влияет на движение одноклеточных организмов (фототаксис) и т.д.

Лабораторная работа 7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Сущность метода

В основу метода положен метод определения хлорофилла по Т. Н. Годневу. Хлорофилл извлекают из растительных тканей с помощью органического растворителя. Вытяжку пигментов фотоколориметрируют. Для получения графика в качестве стандарта используют реактив Гетри.

Реактивы и оборудование:

1 стандарт (по Гетри). 1мл раствора соответствует 0,085 мг хлорофилла.

а) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (1%-ный раствор):

5 г соли растворяют в 0,5 литре дистиллированной воды. Кристаллы соли должны быть синего цвета. Раствор после приготовления фильтруют.

б) бихромат калия, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (2%-ный раствор):

20 г соли растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 1 л.

в) раствор аммиака (7%-ный).

Из полученных трех растворов готовят стандарт, для чего отмеряют 28,5 мл раствора (а) в мерную колбу на 100 мл, в которую вносят 50 мл раствора (б) и 10 мл раствора (в). Смесь доводят дистиллированной водой до метки.

2 карбонат кальция CaCO_3 или карбонат магния MgCO_3 .

3 этиловый спирт (96%) или ацетон или этиловый эфир;

4 кварцевый песок или стекло;

5 ФЭК – 56М, кюветы 10 мм.

Ход анализа

Подготовка пробы к анализу

Подготовка пробы к анализу следует проводить в темной комнате. Вытяжку до фотоколориметрирования следует хранить в темном месте.

Навеску исследуемого материала 50-100 мг тщательно растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком и небольшим количеством углекислого магния или кальция для нейтрализации гомогената. К растертому материалу добавляют несколько мл экстрагента и еще раз осторожно растирают. При использовании эфира или ацетона работу следует проводить в вытяжном шкафу.

Растертую пробу переносят на небольшой стеклянный фильтр диаметром 3-5 см и вытяжку отсасывают под разрежением с помощью водоструйного насоса или насоса Камовского. Для сборки аппарата для фильтрования используют переходники. Если они отсутствуют, поступают следующим образом: в колбе Бунзена с помощью кусочка проволоки или толстой нитки подвешивают пробирку емкостью 25 мл. При этом нитка или проволока зажимается между стенкой горла колбы и резиновой пробкой, в которую вставлен стеклянный фильтр. Фильтрат должен собираться в пробирку.

Оставшуюся на фильтре массу возвращают с помощью шпателя в

ступку, прибавляют снова 4-5 мл растворителя и вновь растирают и фильтруют. Такой прием повторяют 2-3 раза до полного извлечения пигмента (масса на фильтре должна полностью утратить зеленую окраску, а стекающие капли фильтрата должны быть бесцветными), хорошо обмывая ступку и пестик. Следует следить за расходом экстрагента. Нужно использовать на все предыдущие манипуляции не более 20 мл его.

Собранный в пробирке фильтрат количественно переносят в мерные колбы емкостью 25 мл и доводят объем до метки чистым экстрагентом.

Проведение определения

Полученную вытяжку хлорофилла фотоколориметрируют в кювете 10 мм при длине волны 670 нм (690 нм для КФК-2) или при красном светофильтре (ФЭК) относительно раствора использованного экстрагента. Если вытяжка имеет большую оптическую плотность, ее разбавляют чистым экстрагентом. Степень разбавления учитывают при проведении расчетов, введя в числитель формулы коэффициент разбавления.

Получение калибровочного графика

Стандарт по Гетри используют для приготовления растворов сравнения. Для этого в мерные колбы емкостью 25 мл отбирают следующие количества стандарта по Гетри: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15 и 20 мл. Объем раствора в колбах доводят до метки дистиллированной водой. Чтобы рассчитать, какому количеству хлорофилла (с) соответствуют отобранные объемы стандарта по Гетри, эти объемы умножают на 0,085 (количество мг хлорофилла соответствующее 1 мл стандарта).

Растворы сравнения фотоколориметрируют в кювете 10 мм при красном светофильтре относительно кюветы с дистиллированной водой. По результатам строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс содержание хлорофилла мг/25 мл (с), а по оси ординат - оптическую плотность соответствующих растворов сравнения.

Проведение расчетов

Содержание хлорофилла (х) вычисляют в % по формуле:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n},$$

где а – содержание хлорофилла, соответствующее показаниям прибора, мг;

V – объем полученной вытяжки, мл;

n – навеска пробы, мг;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Тема 8: ФЕРМЕНТЫ

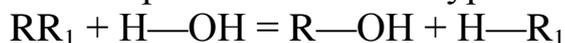
Ферменты – это катализаторы белковой природы, образующиеся и функционирующие во всех живых организмах. Ферменты являются важнейшими компонентами клетки, они теснейшим образом связаны с разнообразными процессами жизнедеятельности. Совокупность биохимических реакций, катализируемых ферментами, составляет сущность обмена веществ, являющегося отличительной чертой всех живых организмов. Через ферментативный аппарат, регуляцию его активности происходит и регуляция скорости метаболических реакций, их направленности.

В настоящее время известно свыше 2000 различных ферментов. Их классификация основывается на характере их действия. В соответствии с рекомендациями комиссии по ферментам «Международного биохимического союза» они подразделены на шесть основных классов:

1 Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные ферменты) – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.

2 Трансферазы (ферменты переноса). Они катализируют перенос целых атомных группировок, например остатков фосфорной кислоты, остатков моносахаридов и аминокислот, аминных или метильных групп от одного соединения к другому.

3 Гидролазы – ферменты, катализирующие расщепление различных сложных органических соединений при участии воды на более простые. Подобное расщепление называют гидролизом, а соответствующие ферменты – гидролазами. Гидролазы катализируют реакции, которые могут быть выражены типовым уравнением:



4 Лиазы – ферменты, катализирующие реакции негидролитического отщепления каких-либо групп от субстратов; при этом образуются двойные связи (или, наоборот, происходит присоединение группы к двойной связи).

5 Изомеразы (ферменты изомеризации). Эти ферменты катализируют превращения органических соединений в их изомеры.

6 Лигаза (синтетаза) – ферменты, катализирующие соединение двух молекул, связанное с расщеплением пирофосфатной связи в АТФ или других нуклеозидтрифосфатах. Эти шесть классов ферментов, в свою очередь, подразделяются на подклассы и еще более мелкие группы.

Каталаза относится к классу оксидоредуктаз, она катализирует разложение пероксида водорода на воду и молекулярный кислород: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Каталаза катализирует метаболизм H_2O_2 – обезвреживает пероксид водорода, образующийся из надпероксидного аниона, а также выделяющийся при аэробном восстановлении флавопротеинов.

Каталаза – двухкомпонентный фермент состоящий из белковой части (апофермента) и небелковой части (простетической группы). Этот фермент обладает абсолютной субстратной специфичностью, то есть способен взаимодействовать только с одним строго определенным субстратом. На соединения простетической группы с белком приводит к огромному возрастанию ее каталитической активности.

Простетическая группа каталазы связывается с белком двумя карбоксилатами (тождественна простетической группе пероксидазы). Каталаза ингибируется синильной кислотой, сероводородом, фторидами. Роль каталазы в организме заключается в том, что она разрушает ядовитый для клеток пероксид водорода.

Активность этого фермента высока почти во всех клетках и органах животных. Она обнаруживается во всех растительных объектах и в большинстве микроорганизмов (кроме облигатных анаэробов). Каталаза в большом количестве находится в особых органеллах растительных и животных клеток – пероксисомах. Каталаза составляет около 40% общего количества белка пероксисом из печени крысы.

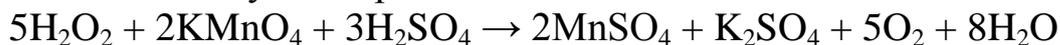
Каталаза разрушает перекиси, образующиеся в организме, а также участвует в метаболизме этилового и метилового спирта. В результате реакции образуется огромное количество мелких пузырьков молекулярного кислорода. На этом основано применение растворов перекиси водорода в медицинской практике для обработки ран, язв, и т.п. При нормальной активности каталазы образующиеся в организме или экзогенные перекиси не успевают окислять эндогенные вещества, в том числе гемоглобин.

Лабораторная работа 8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ (МЕТОД А.Н. БАХА И Д.И. ОПАРИНА)

Сущность метода

Активность каталазы определяют по количеству перекиси водорода, разложившейся под действием фермента. В реакционную смесь вносят избыток перекиси водорода. В контрольном образце каталазу инактивируют серной кислотой, в опытном образце часть внесенной перекиси водорода разлагается под действием фермента, а

количество неразложившейся перекиси водорода определяют титрованием перманганатом калия в кислой среде. При этом происходит следующая реакция:



Количество разложившейся под действием фермента перекиси водорода в соответствии с приведенной реакцией находят по разности между опытным и контрольным титрованием.

Реактивы и оборудование:

- 1 0,1 н. раствор H_2O_2 ;
- 2 10% раствор серной кислоты;
- 3 0,1 н. раствор KMnO_4 ;
- 4 карбонат кальция;
- 5 химическая посуда (конические колбы на 200 мл, пипетки);
- 6 ступки фарфоровые;
- 7 бюретки;
- 8 центрифуга.

Ход работы

2 – 3 г свежего растительного материала растирают в ступке с кварцевым песком. Если реакция растительного материала кислая, то ступку добавляют на кончике шпателя небольшое количество углекислого кальция. В процессе растирания в ступку небольшими порциями добавляют точно 50 мл воды. Растиертую массу количественно переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 – 15 мин при 3–5 тыс. об. в мин.

Для определения активности фермента из центрифужной пробирки берут две пробы по 20 мл ферментной вытяжки и переносят их в конические колбы на 200 мл. В одну из колб, которая служит контролем, приливают 5 мл 10%-ной серной кислоты для инактивации фермента. Затем в обе колбы добавляют по 20 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода. Реакцию разложения перекиси водорода проводят при 20°C в течение 30 мин. После прибавления каждого реактива содержимое колб тщательно перемешивают. Через 30 мин фермент в опытной колбе инактивируют прибавлением в колбу 5 мл 10%-ной серной кислоты.

Затем избыток перекиси водорода в каждой колбе оттитровывают 0,1 н. раствором перманганата калия до образования устойчивого розового окрашивания, не исчезающего в течении 1 мин.

Вычисление результатов: активность каталазы выражают в микромолях перекиси водорода, разложившейся под действием фермента за

1 мин в расчете на 1 г свежего растительного материала. Вычисление ведут по формуле:

$$x = \frac{(aT - вT) \cdot 50 \cdot 50}{n \cdot 20 \cdot 30},$$

где x – активность каталазы;

a – количество 0,1 н KMnO_4 израсходованного на титрование контрольного образца, мл;

$в$ – количество 0,1 н KMnO_4 , израсходованного на титрование опытного образца, мл;

T – поправка в титру 0,1 н KMnO_4 ;

50 – коэффициент пересчета на микромоли H_2O_2 ;

50 – общий объем экстракта, мл;

20 – объем ферментного раствора, взятого для анализа, мл;

30 – время ферментативной реакции, мин;

n – навеска материала, взятого для анализа, г.

Литература

1 Малиновский, В.И. Физиология растений / В.И. Малиновский. – Владивосток: издательство ДВГУ, 2004. – 121с.

2 Полевой, В.В. Физиология растений / В.В. Полевой. – М.: Высшая школа, 1989. - 464 с.

3 Туманов, В.Н. Качественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза: практикум к лабораторным занятиям / В.Н. Туманов, С.Л. Чирук. – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2007. – 62 с.

4 Кретович В.Л. Биохимия растений: Учебник для биологических факультетов университетов. - М.: высш. Школа, 1980. - 445с.

5 Берёзов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия / Москва: Медицина, 1998

6 www.rice.ru/.../calories/vegetables

7 Диксон М. и Уэбб Э. Ферменты. В 3-х т. М., 1982.

8 Горбачев В.В., Горбачева В.Н. Витамины, микро- и макроэлементы. Справочник. -Мн.: Книжный Дом; Интерпрессервис, 2002.- 544с.

Учебное издание

МАКАРЕНКО Татьяна Викторовна
ЗЫКОВА Елена Леонидовна
ПЫРХ Ольга Викторовна

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО РАЗДЕЛУ «АНАЛИЗ
РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА»

Практическое пособие для студентов специальности
1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность)

Редактор *В.И. Шкредова*
Корректор *В.В. Калугина*

0549481 14.05.09

Подписано в печать Формат 60×84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Ризография. Усл. печ. л. Уч.-изд.л.

Тираж экз. Заказ №

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины»
ЛИ № 02330 / 0549481 от 14.05.09.
ЛП № 02330 / 0150450 от 03.02.09
Ул. Советская, 104, 246019, Гомель