

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

Л. С. Дышлюк

**СЫРЬЕ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПИЩЕВОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

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

Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2022

УДК 581.19

Рецензент

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

Дышлюк, Л. С.

Сырье растительного происхождения в пищевой биотехнологии: учеб.-метод. пособие по лабораторным работам для студ. магистратуры по напр. подгот. 19.04.01 Биотехнология / Л. С. Дышлюк. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2021. – 37 с.

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

Табл. 3, рис. 5, список лит. – 13 наименований

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

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

УДК 581.19

© Федеральное государственное
бюджетное образовательное учре-
ждение высшего образования
«Калининградский государственный
технический университет», 2022 г.
© Дышлюк Л. С., 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Методические указания к лабораторным работам.....	5
Правила техники безопасности при работе в лаборатории.....	6
Лабораторная работа № 1. Выделение катехинов из зеленого чая.....	9
Лабораторная работа № 2. Выделение кофеина из черного чая.....	12
Лабораторная работа № 3. Фитохимический анализ растений, содержащих флавоноиды.....	15
Лабораторная работа № 4. Изучение перевариваемости белков хлеба методом Ансона.....	21
Лабораторная работа № 5. Количественное определение аскорбиновой кислоты в растительном сырье разными методами.....	23
Лабораторная работа № 6. Определение фракционного состава целлюлозосодержащего сырья.....	31
Список литературы.....	36

ВВЕДЕНИЕ

Цель настоящего пособия – помочь студентам направления 19.04.01 Биотехнология овладеть основными навыками проведения исследований в области применения сырья растительного происхождения в биотехнологии. Это способствует лучшему усвоению программы курсов «Промышленные и инновационные биотехнологии продуктов из сырья растительного происхождения», «Парафармацевтики в пищевой биотехнологии» и «Биоконверсия и биокатализ в пищевой биотехнологии», «Управление качеством в биотехнологии» в соответствии с действующими государственными стандартами образования.

Лабораторный практикум знакомит студентов с методами выделения биологически активных веществ полифенольной природы (дубильных веществ, алкалоидов) из растительных объектов, методами количественного определения флавоноидов и витаминов в растительном сырье с использованием современных методов физико-химического анализа. Отдельное внимание уделено изучению перевариваемости белков хлеба под действием протеолитических ферментов методом Ансона. Также студенты овладеют навыками определения фракционного состава целлюлозосодержащего сырья как перспективного объекта для биотехнологической переработки (субстрат для биоконверсии).

Методические указания к лабораторным работам

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

К работам в лаборатории студентов допускают после их ознакомления с правилами безопасности (с общими – в начале семестра и с частными – перед каждым занятием). Допуск к выполнению лабораторной работы происходит при условии положительной оценки ответов студентов на устные вопросы, охватывающие тему лабораторной работы. Полнота ответов студентов оценивается в баллах. Студенты, не подготовившиеся к занятию, к выполнению задания не допускаются и выполняют его вне расписания после повторной проверки готовности.

Отчет по лабораторной работе представляется в рукописном виде.

Защита отчета проходит в форме доклада студента по выполненной работе и ответов на вопросы преподавателя. Студент получает максимальное количество баллов при оформлении отчета в соответствии с требованиями и правильных ответах на заданные вопросы. Основанием для снижения количества баллов является:

- небрежное выполнение отчета;
- низкое качество графического материала (отсутствие указания единиц измерения на графиках и т.д.).

Отчет не может быть принят и подлежит доработке в случае отсутствия в нем:

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

Правила техники безопасности при работе в лаборатории

Общие правила поведения в лаборатории

1. Лабораторные работы выполняются учащимися во время, предусмотренное расписанием занятий.
2. В лаборатории следует работать в хлопчатобумажном халате, волосы должны быть убраны.
3. Каждый должен работать на закрепленном за ним рабочем месте, на столе во время работы не должно находиться посторонних предметов.
4. Нельзя работать одному в лаборатории, так как при несчастном случае некому будет оказать помощь пострадавшему.
5. В лаборатории необходимо соблюдать порядок и тишину, правила техники безопасности.
6. Недопустимо в лаборатории принимать пищу, пить воду из химической посуды.
7. Нельзя пробовать на вкус и вдыхать химические вещества.
8. Запрещается проводить какие-либо опыты, не предусмотренные программой практикума, выносить реактивы из лаборатории.
9. К выполнению лабораторной работы можно приступать после тщательного изучения методики и правил работы с приборами.
10. После окончания работы следует вымыть посуду, отключить электроприборы, выключить воду, привести в порядок рабочее место. После выполнения работы необходимо вымыть руки с мылом.

Правила работы с химическими реактивами

Выполнение лабораторной работы неразрывно связано с применением различных реактивов. При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать ряд правил. Несоблюдение их может привести к отравлениям, ожогам, повреждению глаз, дыхательных путей и другим нежелательным последствиям.

1. На всех склянках с реактивами всегда должны быть этикетки с указанием названия реактива и степени его чистоты. Если на банке нет этикетки или надписи, такой реактив применять нельзя.
2. Твердые химические реактивы брать только шпателем, пинцетом или ложечкой.
3. Реактивы необходимо предохранять от загрязнения.
4. Реактивы следует расходовать экономно.
5. Реактивы, изменяющиеся под действием света, следует хранить только в желтых или темных склянках.
6. Не следует брать реактивы с соседних столов.

Правила работы со стеклянной химической посудой

Работа со стеклянной посудой требует внимания, навыков и выполнения ряда правил. Основным травмирующим фактором являются острые осколки

стекла, способные вызвать порезы рук, а также ожоги при неосторожном обращении с нагретыми до высокой температуры частями стеклянной посуды.

1. Для работы используют только чистую посуду без трещин и других повреждений.

2. В опытах с нагревом необходимо пользоваться посудой, которая имеет соответствующую маркировку.

3. При сборке приборов, при укреплении колб в штативе, пробирок в пробиркодержателе не следует применять больших усилий.

Правила техники безопасности при работе с нагревательными приборами

В лаборатории применяют различные нагревательные приборы: электрические плитки, бани, сушильные шкафы, муфельные печи и т. п.

1. Каждый работающий в лаборатории должен знать, где расположены средства пожаротушения, и уметь ими пользоваться.

2. Запрещено использовать неисправные нагревательные приборы.

3. Нельзя оставлять без присмотра работающие электронагревательные приборы.

4. При работе с водяной баней нельзя пробовать степень нагрева воды рукой.

5. После окончания работы необходимо выключить приборы, привести в порядок рабочее место.

Оказание первой помощи при ожогах и других несчастных случаях

Многие химические вещества обладают достаточной силой, чтобы разрушить ткани организма человека. Наибольшим разрушающим потенциалом обладают концентрированные кислоты и щелочи. При воздействии кислот и щелочей на организм человека образуются химические ожоги. Химический ожог – это повреждение тканей, возникающее под действием кислот, щелочей, солей тяжелых металлов, едких жидкостей и других химически активных веществ. Химическое отравление представляет собой ответ организма на вдыхание, проникновение через слизистые оболочки или кожу, проглатывание, химических веществ. Первая помощь при несчастных случаях:

1. При воспламенении горючей жидкости на одежде работающего необходимо немедленно погасить пламя на пострадавшем, завернув его в шерстяное или проасбестованное одеяло.

2. При ожогах концентрированными растворами кислот пораженное место следует промыть сильной струей холодной воды в течение нескольких минут, затем – 2–3%-ным раствором соды, после чего наложить повязку, смоченную 1–2%-ным раствором перманганата калия. При сильных ожогах следует после оказания первой помощи обратиться к врачу.

3. При ожогах концентрированными растворами щелочей пораженное место следует промыть большим количеством холодной воды до тех пор, пока кожа перестанет казаться скользкой, затем – 1–2%-ным раствором борной или

уксусной кислоты, после чего наложить повязку, смоченную спиртовым раствором танина или 1–2%-ным раствором перманганата калия.

4. При термических ожогах пострадавшее место необходимо многократно смочить раствором перманганата калия и спиртом, затем смазать мазью от ожогов.

5. При попадании какого-либо химического реактива в глаза следует промыть их обильным количеством воды и немедленно обратиться к врачу.

6. При отравлении газообразными веществами следует немедленно вывести пострадавшего на свежий воздух, а затем направить к врачу.

7. При порезах подставьте рану под струю холодной воды. Обработайте рану перекисью водорода (3 %), а края раны йодом или зеленкой.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. ВЫДЕЛЕНИЕ КАТЕХИНОВ ИЗ ЗЕЛЕНОГО ЧАЯ

Цель работы: выделить катехины из зеленого чая, провести качественные реакции на выделенные катехины.

1.1 Теоретические положения

Катехины – фенольные вещества растительного происхождения. Катехины – бесцветные кристаллические вещества, часто обладают горьковато-вяжущим вкусом, хорошо растворимы в воде и спирте. При полимеризации катехины образуются дубильные вещества. Катехины обнаружены во многих съедобных плодах (яблоки, персики, абрикосы, айва, сливы, вишни) и ягодах (земляника, смородина, малина, крыжовник, брусника). Большое количество катехинов содержится в молодых побегах чайного растения (до 20–25 % от сухой массы) и акации катеху (отсюда название), в винограде (главным образом в косточках и кожице), бобах какао. Из листьев чая катехины получают в промышленном масштабе [1].

Катехины обладают высокой биологической активностью; они регулируют проницаемость капилляров и увеличивают упругость их стенок, а также способствуют более эффективному использованию организмом аскорбиновой кислоты. Поэтому катехины относят к веществам, обладающим Р-витаминной активностью, и используют при лечении заболеваний, связанных с нарушениями функций капилляров, отеках сосудистого происхождения и т.п. Катехины чая обладают антимикробными свойствами и применяются при лечении дизентерии. Окислительные превращения катехины играют важную роль в технологии пищевых производств, таких как ферментация чая, виноделие, изготовление какао [2].

Дубильные вещества чая представляют собой смесь нескольких катехинов и их галловых эфиров (рисунок 1.1). Главные компоненты смеси: *l*-эпикатехин, *l*-галлокатехин, их эфиры с галловой кислотой. Например, таниды из листьев цейлонского чая содержат *l*-эпикатехин (6,5 %), галлокатехин (24,2 %), эпикатехингаллат (9 %), галлокатехингаллат (49 %). Самых же танидов в зеленом чайном листе – 22–24, в черном чае – 14–17 % от веса сухих веществ [3].

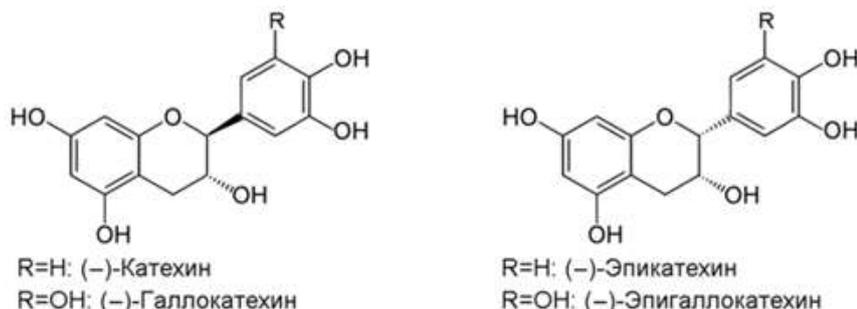


Рисунок 1.1 – Формулы катехинов

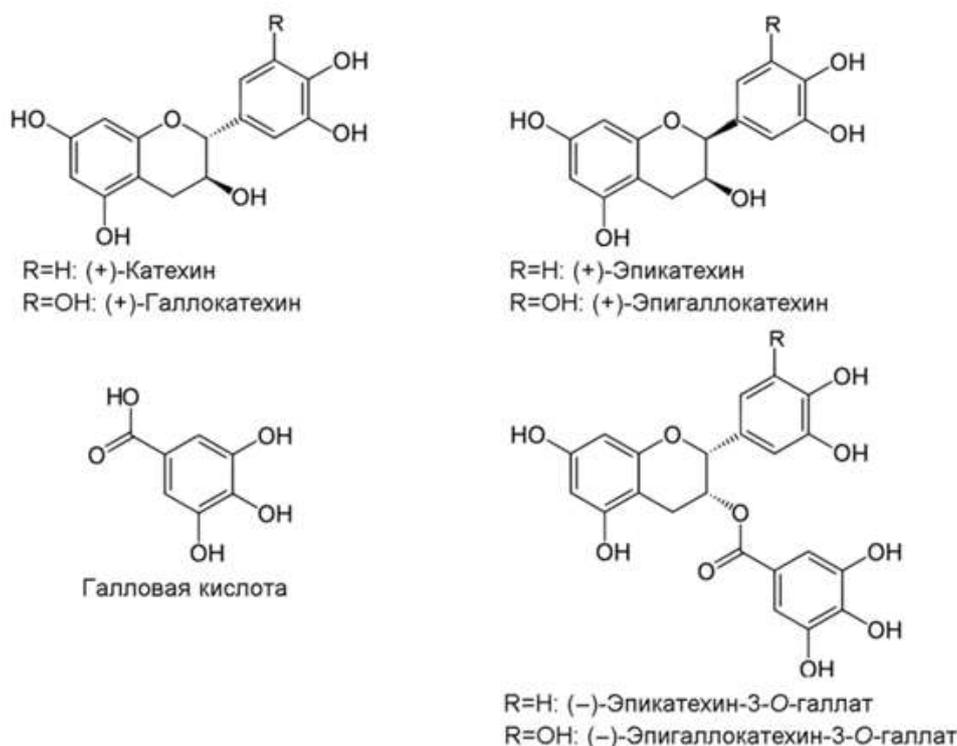


Рисунок 1.1. Продолжение

Катехины чая – негидролизующиеся дубильные вещества. От нагревания с разбавленными кислотами они превращаются в нерастворимые продукты уплотнения, так называемые флобафены.

1.2 Задание

1. Выделить катехины из зеленого чая.
2. Провести качественные реакции на выделенные катехины.

1.3 Порядок выполнения работы

Материалы и реактивы: зеленый чай неферментированный, вода дистиллированная, свинец уксуснокислый кристаллический, 1%-ный раствор серной кислоты, этилацетат, 1%-ный раствор желатины, 1%-ный раствор хинина хлорида, 1%-ный раствор железоаммонийных квасцов, 10%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор средней соли свинца ацетата, натрий уксуснокислый кристаллический, 1%-ный раствор ванилина в концентрированной хлористоводородной кислоте.

Оборудование, лабораторная посуда: весы аналитические, конические колбы, пробирки, фарфоровая воронка, фильтровальная бумага, водяная баня.

Ход работы:

1.3.1 Выделение катехинов из зеленого чая

Неферментированный зеленый чай загрузить в коническую колбу, залить 300 см³ горячей воды и нагреть в течение 1 ч на кипящей водяной бане. Раствор отфильтровать через полотняный фильтр на фарфоровой воронке, а остаток об-

работать повторно водой. К объединенному экстракту добавить ацетат свинца (15 г) до полного осаждения таната свинца. Темный осадок отфильтровать. Промыть водой, обработать 1%-ным раствором серной кислоты до кислой реакции.

Сульфат свинца отфильтровать, раствор промыть три раза этилацетатом (порциями по 20 см³). Этилацетат отогнать на водяной бане; остаток высушить. Полученный танин измельчить в порошок и взвесить. Выход катехинов должен составить 3–4 г. Танин из зеленого чая представляет собой аморфный порошок, легко растворимый в воде и спирте.

1.3.2 Проведение качественных реакций на катехины, выделенные из зеленого чая

Осадочная реакция с белками

Растворить навеску танина (2 г), выделенного по п. 1.3.1, в 100 см³ дистиллированной воды. К 2 см³ полученного раствора добавить по каплям 1%-ный раствор желатины. Результат – появляется муть, исчезающая при добавлении избытка желатины.

Осадочная реакция с алкалоидами

К 2 см³ полученного раствора (п. 1.3.2) добавить несколько капель 1%-ного раствора хинина хлорида. Результат – появляется аморфный осадок.

Цветная реакция с железоммонийными квасцами

К 2 см³ полученного раствора (п. 1.3.2) добавить 4 капли раствора железоммониевых квасцов. Результат – образование черно-синего (гидролизующие танны) или черно-зеленого окрашивания (конденсированные танины) или осадка.

Цветная реакция с ацетатом свинца

К 1 см³ полученного раствора (п. 1.3.2) добавить 2 см³ 10%-ной уксусной кислоты и 1 см³ 10%-ной средней соли свинца ацетата. При наличии гидролизующих дубильных веществ образуется осадок. Осадок отфильтровать. К фильтрату прибавить 5 капель 1%-ного раствора железоммониевых квасцов и 0,1 г кристаллического натрия ацетата. При наличии конденсированных дубильных веществ появляется черно-зеленое окрашивание или осадок.

Цветная реакция с ванилином

К 2 см³ полученного раствора (п. 1.3.2) добавить несколько капель 1%-ного раствора ванилина в концентрированной хлористоводородной кислоте. Результат – красно-малиновое окрашивание (производные флороглюцина и резорцина).

Вопросы для самоконтроля

1. Какой вид выделения биологически активных веществ из растительного сырья применен в данной работе?
2. Что означает понятие «негидролизующиеся дубильные вещества»?
3. Какое соединение образуется при обработке экстракта ацетатом свинца?
4. Какова биологическая активность катехинов чая?
5. К какому классу химических веществ относится *l*-эпикатехингаллат?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. ВЫДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА ИЗ ЧЕРНОГО ЧАЯ

Цель работы: выделить кофеин из черного чая, провести качественные реакции на выделенный кофеин.

2.1 Теоретические положения

Кофеин – это алкалоид, обладающий наркотическими свойствами и содержащийся в таких растениях, как кофейное дерево, чай, гуарана и некоторых других. Также кофеин производится синтетически. Содержится в различных напитках (значительнее всего в чае), оказывает стимулирующее действие на нервную систему, сердце и скелетные мышцы. Содержание кофеина в листьях чая достигает 3, в зернах кофе – 1,5 % (рисунок 2.1).

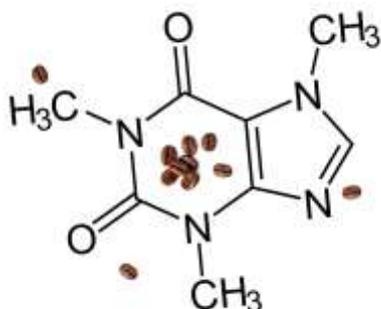


Рисунок 2.1 – Формула и внешний вид кофеина

Химическое название кофеина – 1,3,7-триметилксантин. Соединяясь с водой, образует кофеидин $C_7H_{12}N_4O$. По строению и фармакологическим свойствам кофеин близок к теобромину и теофиллину; все три алкалоида относятся к группе метилксантинов. Кофеин лучше действует на центральную нервную систему, а теофиллин и теобромин – в качестве стимуляторов сердечной деятельности и лёгких мочегонных средств [4].

Физические свойства кофеина: белые шелковистые игольчатые кристаллы или белый кристаллический порошок горьковатого вкуса, без запаха. Плохо растворим в воде (1:60), легко – в горячей (1:2), трудно растворим в спирте (1:50). $T_{пл.} = 234\text{ }^{\circ}C$.

Качественной реакцией на кофеин служит образование соединений темно-коричневой окраски под действием концентрированной соляной кислоты на аммиачный раствор анализируемого образца.

Наличие примесей в кофеине проводят методом тонкослойной хроматографии, используя в качестве тонкого слоя силикагель GF 254.

2.2 Задание

1. Выделить кофеин из черного чая.
2. Провести качественные реакции на выделенный кофеин.

2.3 Порядок выполнения работы

Материалы и реактивы: чай черный листовый, окись магния, хлороформ, 25%-ная соляная кислота, 0,1 М серная кислота, 0,1 М гидроксид натрия, 5%-ная перекись водорода, кодеин, водный раствор аммиака, вода дистиллированная.

Оборудование, лабораторная посуда: весы аналитические, водяная баня, рН-метр, электрическая плитка, коническая колба на 500 см³, воронка стеклянная, выпарная чашка, нисходящий холодильник, круглодонная колба на 250 см³, плоскодонная колба на 200 см³, стеклянный стакан на 100 см³, бумага фильтровальная.

Ход работы:

2.3.1 Выделение кофеина из черного чая путем экстрагирования

К тонко измельченному черному чаю или к чайной пыли прилить взвесь окиси магния (25 г MgO в 150 см³ воды), 250 см³ воды и кипятить 10–15 мин. Водный раствор декантировать через тампончик ваты. Кипячение повторить еще два раза с новыми порциями воды по 150 см³. Объединенную водную вытяжку подкислить 25 см³ разбавленной серной кислоты (проверить по конго кислотность среды) и концентрировать в выпарительной чашке на водяной бане до одной трети объема. Горячий раствор профильтровать через складчатый фильтр, остудить и 5 раз производят извлечение хлороформом. На каждую экстракцию затратить 30 см³ растворителя.

Хлороформную вытяжку промыть сначала несколькими миллилитрами разбавленной щелочи, а затем таким же количеством воды. Растворитель отогнать на водяной бане. В остатке получить сырой кофеин, который перекристаллизовывать из 8–10 мл горячей воды. Выход кофеина должен составить 0,8–1 г. Кофеин кристаллизуется в тонких белых, шелковистых иглах.

2.3.2 Получение кофеина путем возгонки из сухого чая

Небольшое количество (1–2 г) растёртого чая поместить на часовое стекло и накрыть его вторым часовым стеклом. Осторожно нагревая, наблюдать возгонку кофеина. Он оседает на верхнем стекле в виде длинных, слегка окрашенных игл.

2.3.3 Проведение качественных реакций на выделенный кофеин

К 10 мг кофеина прилить десять капель 5%-ной перекиси водорода, одну каплю 25%-ной соляной кислоты и выпарить на водяной бане. Остаток разделить на две части. Первую часть тотчас увлажнить небольшим количеством водного раствора аммиака. Должна появиться пурпуровая окраска, обусловленная образованием аммонийной соли тетраметил-аллоксантина.

Ко второй части добавить 3 капли воды и 5 мг кодеина. Должна появиться васильково-синяя окраска.

Вопросы для самоконтроля

1. К какому классу химических веществ относится кофеин?
2. Какое сырье содержит большее количество кофеина?
3. Суть процесса извлечения кофеина хлороформом.
4. Опишите качественные реакции на кофеин.

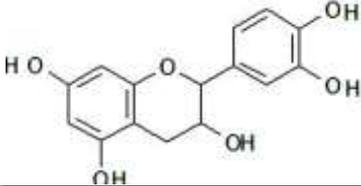
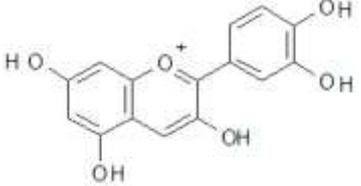
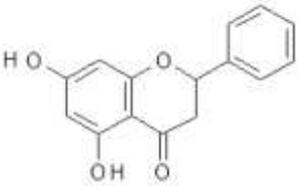
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ФЛАВОНОИДЫ

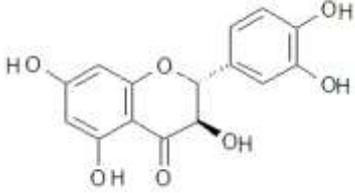
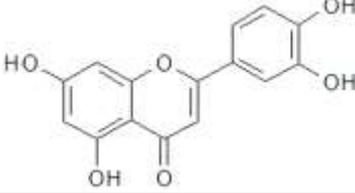
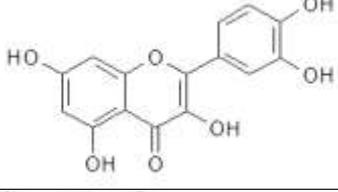
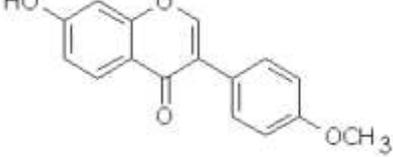
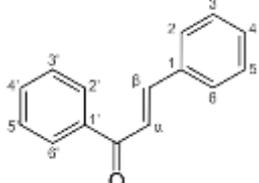
Цель работы: провести качественные реакции и количественное определение флавоноидов в разных видах растительного сырья.

3.1 Теоретические положения

Флавоноиды – это фенольные соединения, в своей структуре имеющие фрагмент дифенилпропана ($C_6-C_3-C_6$). Флавоноиды обладают противоопухолевыми, антиоксидантными, кардиопротекторными, нейропротекторными и другим свойствами [5]. Термин «флавоноид» был предложен в 1949 году английским ученым Гейссманом более века спустя после выделения первого флавоноида кверцетина (*Quercus*) не только для флавонов – веществ желтого цвета, но и для других соединений флавоноидной природы, имеющих иную окраску – белую или бесцветную (флаваноны), оранжевую (ауроны, халконы), красную, малиновую, синюю (антоцианы). Флавоноиды представляют собой кристаллические соединения желтого, оранжевого или оранжево-красного, и синего цвета, также встречаются и бесцветные флавоноиды (таблица 3.1) [6].

Таблица 1.3.1 – Перечень основных флавоноидов

Название	Формула	Природный источник
1	2	3
Катехины (флаван-3-олы)		Чай
Антоцианидины (цианидины)		Плоды рябины черноплодной
Флаваноны		Почки тополя, цветки бессмертника песчаного и плоды лимона

1	2	3
Флаванолы		Листья китайского чая, древесина сосны обыкновенной и лиственницы сибирской, почки тополя
Флавоны		Цветки пижмы обыкновенной
Флаванолы		Цветки софоры японской
Изофлавоны		Корни солодки и стальника
Халконы		Корни солодки и цветках бессмертника песчаного

Химическая классификация флавоноидов основана на трех основных признаках: степень окисленности кольца С или пропанового фрагмента; величина гетероцикла (С); положение бокового фенила.

Катехины (флаван-3-олы) – бесцветные соединения, которые, являясь наиболее восстановленными флавоноидами, легко поддаются окислению, в результате чего приобретают розовую или красную окраску. Характерным примером может служить чай, различный цвет которого (черный, красный, желтый) обусловлен степенью окисленности катехинов.

Особенностью строения *антоцианидинов* является наличие свободной валентности у кислорода в пирановом кольце. Благодаря положительному заряду антоцианидины в кислом растворе ведут себя как катионы и образуют соли с кислотами, в щелочном растворе – как анионы и образуют соли с основаниями.

Флаваноны – группа флавоноидов, содержащих один ассиметрический атом углерода (при С-2), УФ спектры которых имеют один интенсивный максимум поглощения при 289 нм. Флаваноны не содержат хромофоров, поэтому, как правило, не имеют окраски. В лекарственных растениях наиболее распространены пиноцембрин, пиностробин (почки тополя), нарингенин (цветки бессмертника песчаного), эриодиктиол и гесперетин (плоды лимона).

Флаванолы – группа флавоноидов, содержащих два асимметрических атома углерода (при С-2 и С-3), УФ спектры которых имеют один интенсивный максимум поглощения при 289 нм. Флаванолы не содержат в себе хромофоров, поэтому, как правило, не имеют окраски. В лекарственных растениях наиболее распространены дигидрокемпферол (листья чая китайского), пинобанксин (древесины сосны обыкновенной), почки тополя), таксифолин (древесина лиственницы сибирской).

Флавоны – широко распространенная группа флавоноидов, имеющих, как правило, светло-желтую, желтую или желто-зеленую окраску. Для УФ спектров флавонов характерны два максимума поглощения – при 270 нм (коротковолновый максимум) и при 340–350 нм (длинноволновый максимум), что успешно используется в методиках количественного определения веществ с применением спектрофотометрического метода. Наиболее распространенными агликонами флавонов являются хризин, апигенин, акацетин, лютеолин, диосметин, хризоериол, диуретин и трицин.

Флавонолы – широко распространенная группа флавоноидов, имеющих, как правило, желтую или желто-зеленую окраску. Для УФ спектров флавонолов характерны два максимума поглощения при – 260 нм (коротковолновый максимум) и при 360–370 нм (длинноволновый максимум), что успешно используется в методиках количественного определения веществ с использованием спектрофотометрического метода. Наиболее распространенными агликонами флавонолов являются галангин, кемпферол, кверцетин, изорамнетин, мирицетин, гербацетин.

Изофлавоны отличаются от других групп флавоноидов положением бокового фенильного кольца, которое находится не у С-2, а у С-3.

Халконы – флавоноиды с раскрытым у-пироновым кольцом (С). В кислой среде халконы превращаются в соответствующие флаванолы. Типичными халконами являются ликуразид (агликон – изоликвиритигенин) и изосалипурпозид [7].

3.2 Задание:

1. С помощью качественных реакций доказать наличие флавоноидов в траве горца птичьего, траве зверобоя и листьях березы.
2. Провести количественное определение флавоноидов в траве горца птичьего, траве зверобоя и листьях березы спектрофотометрическим методом.

3.3 Порядок выполнения работы

Материалы и реактивы: трава горца птичьего, трава зверобоя, листья березы, 50%-ный этиловый спирт, 70%-ный этиловый спирт, 95%-ный этиловый спирт, 2%-ный спиртовой раствор алюминия хлорида, ГСО рутина, кислота хлористоводородная концентрированная, кислота уксусная разбавленная, магний металлический, вода дистиллированная.

Оборудование, лабораторная посуда: весы аналитические, водяная баня, рН-метр, электрическая плитка, обратный холодильник, колбы мерные,

колбы конические термостойкие, мерные цилиндры, бумага фильтровальная, керамическая ступка с пестиком, спектрофотометр.

Ход работы:

3.3.1 Проведение качественных реакций на флавоноиды травы горца птичьего (спорыша)

Около 1 г измельченного сырья прокипятить в течение 5 мин с 20 см³ 70%-ного этилового спирта и профильтровать через бумажный фильтр. К 5 см³ фильтрата добавить 3 см³ 2%-ного спиртового раствора алюминия хлорида; должно появиться желто-зеленое окрашивание (флавоноиды).

3.3.2 Количественное определение флавоноидов в траве горца птичьего (спорыша)

Аналитическую пробу сырья измельчить до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья поместить в колбу со шлифом вместимостью 150 см³, прибавить 30 см³ 70%-ного этилового спирта, колбу присоединить к обратному холодильнику и нагреть на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охладить до комнатной температуры под струей холодной воды и профильтровать через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 см³. Экстракцию повторить еще 2 раза указанным выше способом.

Объединенные извлечения повторно профильтровать через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промыть 70%-ным этиловым спиртом и довести объем фильтрата тем же спиртом до метки (раствор А). 4 см³ раствора А поместить в мерную колбу вместимостью 25 см³, прибавить 2 см³ 2%-ного раствора алюминия хлорида в 95%-ном этиловом спирте и довести объем раствора 95%-ным спиртом до метки; через 20 мин измерить оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовать следующий раствор: 4 см³ раствора А поместить в мерную колбу вместимостью 25 см³, прибавить 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и довести объем раствора 95%-ным спиртом до метки. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на авикулярин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычислить по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{330 \cdot m(100 - W)}, \quad (3.1)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; 330 – удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом при 410 нм; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

3.3.3 Проведение качественных реакций на флавоноиды травы зверобоя

Для получения извлечения аналитическую пробу сырья измельчить до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья поместить в колбу со шлифом вместимостью 150 см³, прибавить 30 см³ 50%-ного этилового спирта. Колбу присо-

единить к обратному холодильнику и нагреть на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение профильтровать через вату в мерную колбу вместимостью 100 см³ так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. Вату поместить в колбу для экстрагирования и прибавить 30 см³ 50%-ного этилового спирта. Экстракцию повторить еще дважды в описанных выше условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу.

К 1 см³ полученного извлечения прибавить 2 см³ 2%-ного раствора алюминия хлорида в 95 %-ном этиловом спирте и 7 мл 95%-ного этилового спирта; раствор должен окраситься в зеленовато-желтый цвет (флавоноиды).

3.3.4 Количественное определение флавоноидов в траве зверобоя

После охлаждения объем извлечения, полученного согласно п. 3.3.3, довести 50%-ным этиловым спиртом до метки и перемешать (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 см³ поместить 1 см³ раствора алюминия хлорида в 95%-ном спирте и довести объем раствора 95%-ным спиртом до метки. Через 40 мин измерить оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовать раствор, состоящий из 1 см³ извлечения, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95%-ным спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 см³. Параллельно измерить оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычислить по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100 \cdot (100 - m)}, \quad (3.2)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутин; m – масса сырья в граммах; m_0 – масса ГСО рутин в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Приготовление ГСО рутин: около 0,05 г (точная навеска) ГСО рутин, предварительно высушенного при температуре 130–135 °С в течение 3 ч, растворить в 85 см³ 95%-ного этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 см³ при нагревании на водяной бане, охладить, количественно перенести в мерную колбу вместимостью 100 см³, довести объем раствора тем же спиртом до метки и перемешать.

3.3.5 Проведение качественных реакций на флавоноиды листьев березы

0,03 г измельченного сырья поместить в пробирку, прибавить 5 см³ 95%-ного этилового спирта и перемешать в течение 3 минут. Затем прибавить 10 капель кислоты хлористоводородной концентрированной, 0,015 г магния металлического и нагреть на кипящей водяной бане в течение 3 мин. Через 5 мин должно появиться розовое окрашивание (флавоноиды).

3.3.6 Количественное определение флавоноидов в листьях березы

Аналитическую пробу сырья измельчить до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья поместить в колбу со шлифом вместимостью 200 см³, прилить 100 см³ 50%-ного спирта и взвесить. Колбу с содержимым присоединить к обратному холодильнику и нагреть на кипящей водяной бане в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвесить, довести ее массу 50%-ным этиловым спиртом до первоначальной, перемешать и профильтровать через бумажный фильтр. 1 см³ полученного извлечения поместить в мерную колбу вместимостью 25 см³, прилить 1 см³ 2%-ного раствора алюминия хлорида в 95%-ном спирте и довести объем 95%-ным этиловым спиртом до метки. Через 40 мин измерить оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовать раствор, состоящий из 1 см³ извлечения, 1 капли кислоты уксусной разбавленной и доведенный 95%-ным спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 см³. Раствор выдержать в течение 40 мин. Параллельно измерить оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m(100 - W)}, \quad (3.3)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m – масса сырья в граммах; m_0 – масса ГСО рутина в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение флавоноидов.
2. На каких показателях основана классификация флавоноидов?
3. Назовите основные классы флавоноидов.
4. Опишите качественную реакцию на флавоноиды.
5. Опишите методику количественного определения флавоноидов в растительном материале.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТИ БЕЛКОВ ХЛЕБА МЕТОДОМ АНСОНА

Цель работы: изучить процесс перевариваемости белков хлеба под действием протеолитических ферментов.

4.1 Теоретические положения

По данным ФАО, норма потребления белка составляет 12–15 % общей калорийности суточного рациона человека, или 90–100 г, в том числе 60–70 % белка животного происхождения. Однако 95 % населения земного шара испытывают белковый дефицит, особенно в животных белках, отличающихся полным набором и сбалансированностью аминокислотного состава. Ввиду многообразия природных белков для источников питания приняты оценочные критерии, в частности питательная ценность, или качество белка.

Питательная ценность белков определяется двумя факторами: аминокислотным составом и степенью усвояемости животным организмом, которая в свою очередь, складывается из переваримости белка ферментами пищеварительного тракта и доли всасывания в тонком отделе кишечника. Для определения питательной ценности белков в лабораторных опытах часто ограничиваются оценкой переваримости *in vitro* системой основных пищеварительных ферментов (пепсин+трипсин) в условиях, приближенных к биологическим в желудочно-кишечном тракте животных организмов [8, 9].

Для измерения перевариваемости белков хлеба под действием протеолитических ферментов используют метод Ансона (ГОСТ 20264.4-89), основанный на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы. Амилолитическая активность характеризует способность амилолитических ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в 1 г препарата.

За единицу амилолитической активности (АС) принята способность фермента при определенных значениях температуры, рН и времени действия катализировать до декстринов различной молекулярной массы 1 г крахмала, что составляет 30 % крахмала, введенного в реакцию.

4.2 Задание:

1. Измерить перевариваемость белков хлеба под действием протеолитических ферментов по методу Ансона.
2. Построить графики динамики гидролиза белков хлебного мякиша под действием пепсина.

4.3 Порядок выполнения работы

Материалы и реактивы: глицин, 0,2 М соляная кислота, 0,02%-ный раствор пепсина, 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, вода дистиллированная.

Оборудование, лабораторная посуда: весы аналитические, водяная баня, электрическая плитка, термостат, центрифуга, спектрофотометр.

Ход работы:

4.3.1 Приготовление глицинового буфера (pH 2,2)

15 г глицина растворить в 1000 мл дистиллированной воды, 25 мл полученного раствора поместить в мерную колбу на 100 см³ и прилить 22 см³ 0,2 М раствора соляной кислоты; довести до метки дистиллированной водой.

4.3.2 Изучение процесса перевариваемости белков хлеба под действием протеолитических ферментов

В качестве субстрата используется 20%-ная хлебная суспензия в глициновом буфере (pH = 2,2). К 10 см³ полученного субстрата, приготовленного из мякиша хлеба и выдержанного в термостате при температуре 37 °С в течение 20 мин, добавить 10 см³ 0,02%-ного раствора пепсина. Гидролиз провести при температуре 37 °С в течение 90 мин в термостате. При этом через каждые 30 мин из реакционной пробы, не прерывая опыта, отбирать по 2 см³ исследуемой суспензии в стакан. Затем в сосуд внести такой же объем глицинового буфера. К отобранной для анализа суспензии добавить 3 см³ 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для ингибирования протеолиза и поставить стаканы с суспензией в термостат. Через 90 мин осадок отделить центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об/мин. В надосадочной жидкости провести определение оптической плотности растворов, содержащих продукты гидролиза белка с помощью фотоэлектрокалориметра в кювете с шириной грани 1 см при длине волны 300 нм. Значение переваримости можно получить взвешиванием остатков переваривания.

4.3.3 Обработка результатов

Полученные результаты внести в таблицу 4.1.

Таблица 4.1 – Результаты эксперимента

Объем раствора пепсина	Оптическая плотность

Построить графики динамики гидролиза белков хлебного мякиша под действием пепсина.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите факторы, определяющие питательную ценность белков.
2. Что означает термин «протеолитическая активность»?
3. Опишите методику определения перевариваемости белков хлеба по Ансону.
4. На основании полученных результатов сделайте вывод о динамике гидролиза белков хлебного мякиша под действием пепсина.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ

Цель работы: определить содержание аскорбиновой кислоты в растительном сырье разными методами.

5.1 Теоретические положения

Витамины – низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, необходимые всем живым организмам в небольших количествах для нормального протекания биохимических и физиологических процессов. Многие витамины входят в состав двухкомпонентных ферментов и участвуют в качестве катализаторов в белковом, углеводном, липидном и минеральном обмене, улучшают использование всех питательных веществ, способствуют повышению устойчивости человека и животных к болезням [10].

Витамины не являются структурными и энергетическими веществами. В организме человека и животных витамины принимают участие в регенерации тканей (кожи, волос, половых клеток), передаче нервных сигналов, световосприятии, транспорте веществ через стенки кишечника и кровеносных капилляров. Некоторые витамины обладают антиоксидантными и антимуtagenными свойствами.

Растения и микроорганизмы способны синтезировать все необходимые для их жизнедеятельности витамины. Человек и животные получают витамины с пищей или синтезируют их из предшественников (провитаминов). Содержание витаминов является важным показателем биологической ценности продуктов питания и кормов. Содержание водорастворимых витаминов обычно выражают в мг/100 г (мг %), а содержание жирорастворимых витаминов – в Международных единицах (МЕ).

Витамины делят на жирорастворимые (А, Д, Е, К) и водорастворимые (В1, В2, В3, В5, В6, В12, Р, С, Н, Вс, U, инозит, *n*-аминобензойная кислота, ПАБК) [11].

Витамин С (аскорбиновая кислота) – один из наиболее важных водорастворимых витаминов, который принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях в клетках живых организмов и влияет на их устойчивость к неблагоприятным условиям среды и болезням. При частичном недостатке витамина С (гиповитаминозе) у человека появляется головная боль, головокружение, повышается утомляемость. При полном отсутствии витамина С (авитаминозе) наблюдается кровоточивость десен, расшатывание и выпадение зубов (болезнь скарбут или цинга). Следы железа, меди, щелочная реакция, нагревание в присутствии кислорода воздуха разрушают витамин С.

В процессе обмена веществ аскорбиновая кислота окисляется в дегидроаскорбиновую, которая витаминной активностью не обладает. Взаимное превращение этих двух форм в окислительно-восстановительных процессах клетки можно представить схемой (рисунок 5.1)

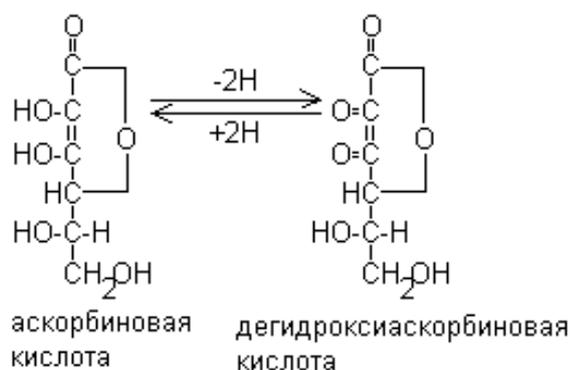


Рисунок 5.1 – Взаимное превращение двух форм витамина С

В растительных тканях аскорбиновая кислота находится как в свободном, так и в связанном с биоколлоидами протопласта состоянии.

Для количественного определения аскорбиновой кислоты в продуктах переработки плодов и овощей существует ГОСТ 24556-89, устанавливающий методы определения витамина С:

- титриметрический с визуальным титрованием – для определения аскорбиновой кислоты в продуктах, дающих светлоокрашенные экстракты;
- титриметрический с потенциометрическим титрованием;
- фотометрический для определения аскорбиновой кислоты в продуктах, дающих темноокрашенные экстракты;
- титриметрический с цистеином;
- флуорометрический для определения суммы аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот.

Титриметрический метод основан на экстрагировании витамина С раствором кислоты (соляной, метафосфорной или смесью уксусной и метафосфорной) с последующим титрованием визуальным или потенциометрически раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до установления светло-розовой окраски. Титрование может быть визуальным и потенциометрическим.

Титриметрический метод с использованием цистеина основан на экстрагировании витамина С из продукта раствором метафосфорной кислоты, восстановлении дегидроаскорбиновой кислоты в аскорбиновую цистеином солянокислым при рН 7,0–7,5, устранении влияния редуцирующих веществ в присутствии формальдегида при рН, близком к нулю, и титровании раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Метод применяется при возникновении разногласий в оценке качества.

Фотометрический метод основан на экстрагировании витамина С метафосфорной кислотой или смесью уксусной и метафосфорной кислот, восстановлении 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия аскорбиновой кислотой с последующей экстракцией органическим растворителем (амилацетатом, бутилацетатом или ксилолом) избытка 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия и фотометрировании органического экстракта при длине волны 500 нм.

5.2 Задание:

1. Определить содержание аскорбиновой кислоты методом визуального титрования в растительных объектах: ягоды облепихи, ягоды черной смородины, сладкий перец, квашеная капуста.

2. Определить содержание аскорбиновой кислоты методом визуального титрования с использованием цистеина в растительных объектах: ягоды облепихи, ягоды черной смородины, сладкий перец, квашеная капуста.

3. Определить содержание аскорбиновой кислоты фотометрическим методом в растительных объектах: ягоды облепихи, ягоды черной смородины, сладкий перец, квашеная капуста.

5.3 Порядок выполнения работы

Материалы и реактивы: ягоды облепихи, ягоды черной смородины, перец сладкий, капуста квашеная, 2%-ный раствор соляной кислоты, 3%-ный раствор метафосфорной кислоты, ледяная уксусная кислота, аскорбиновая кислота кристаллическая, 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия кристаллический, натрий двууглекислый кристаллический, натрий уксуснокислый безводный, формальдегид, фосфорнокислый калий двузамещенный, цистеин, серная кислота, ацетон, гидрохинон, вода дистиллированная, бумага фильтровальная.

Оборудование, лабораторная посуда: весы аналитические, гомогенизатор, рН-метр, мешалка магнитная, секундомер, воронки лабораторные стеклянные, колбы мерные вместимостью 100, 500, 1000 см³, колбы конические вместимостью 50, 100, 250 см³, бюретка, палочки стеклянные, пипетки лабораторные стеклянные, стаканы лабораторные стеклянные, ступка и пестик фарфоровые, цилиндры мерные лабораторные, центрифуга лабораторная, спектрофотометр.

Ход работы:

5.3.1 Приготовление экстрагирующего раствора

В качестве экстрагирующего раствора использовать растворы кислот – соляной с массовой долей 2 %, метафосфорной с массовой долей 3 % или смеси уксусной и метафосфорной кислот, которую приготовить следующим образом: 15 г метафосфорной кислоты растворить в 250 см³ дистиллированной воды, прибавить 40 см³ ледяной уксусной кислоты, довести водой до объема 500 см³, перемешать и профильтровать в склянку с притертой пробкой. Хранить в холодильнике не более 10 дней.

5.3.2 Приготовление стандартных растворов аскорбиновой кислоты

Для приготовления раствора аскорбиновой кислоты концентрации 1,0 г/дм³ взвесить 0,1000 г аскорбиновой кислоты с погрешностью не более ±0,0001 г, растворить в экстрагирующем растворе в мерной колбе вместимостью 100 см³, довести до метки тем же раствором и перемешать. Для приготовления раствора концентрации 0,1 г/дм³ внести пипеткой 10 см³ раствора аскорбиновой кислоты концентрации 1,0 г/дм³ в мерную колбу вместимостью 100 см³, довести до метки экстрагирующим раствором и перемешать. Растворы неустойчивы, поэтому их необходимо готовить перед проведением испытания.

5.3.3 Приготовление раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия и определение его титра

0,05 г 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия растворить приблизительно в 150 см³ горячей воды, предварительно прокипяченной в течение 30 мин или содержащей 0,042 г двууглекислого натрия, охладить до комнатной температуры, довести до объема 200 см³ той же охлажденной водой, перемешать и профильтровать в темную склянку. Раствор хранить в холодильнике не более 10 дней. Титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия установить по стандартному раствору аскорбиновой кислоты концентрации 1,0 и 0,1 г/дм³ в день проведения испытания. Для этого в две колбы вместимостью 50 или 100 см³, в которые предварительно прибавлено по 9 см³ воды, внести пипеткой по 1 см³ раствора аскорбиновой кислоты и быстро титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до светло-розовой окраски, не исчезающей в течение 15–20 с.

Одновременно провести контрольное испытание. Для этого в колбу вместимостью 50 или 100 см³ внести 1 см³ экстрагирующего раствора, 9 см³ дистиллированной воды и титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия в граммах аскорбиновой кислоты, эквивалентного одному кубическому сантиметру раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, вычислить по формуле:

$$T = \frac{m}{V_1 - V_2}, \quad (5.1)$$

где m – масса аскорбиновой кислоты, содержащаяся в 1 см³ стандартного раствора, г; V_1 – объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованный на титрование стандартного раствора аскорбиновой кислоты, см³; V_2 – объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованный на контрольное испытание, см³.

5.3.4 Приготовление раствора ацетатного буферного (рН 4)

Растворить 300 г безводного уксуснокислого натрия в 700 см³ дистиллированной воды, добавить 1000 см³ ледяной уксусной кислоты, перемешать и с помощью рН-метра установить рН 4, добавляя, при необходимости, снова кислоту.

5.3.5 Экстрагирование растительного сырья

Навеску пробы от 5 до 50 г гомогенизировать не более 2 мин с небольшим количеством экстрагирующего раствора (не менее 1 см³ раствора на 1 г пробы) и перенести в мерные колбу или цилиндр вместимостью 100 см³, смывая гомогенизатор небольшими порциями экстрагирующего раствора до тех пор, пока объем не достигнет метки. Содержимое выдержать в течение 10 мин, перемешать и профильтровать. Полученные экстракты сразу использовать для титрования.

5.3.6 Определение содержания аскорбиновой кислоты в растительных объектах методом визуального титрования

В колбу вместимостью 50 или 100 см³ пипеткой внести от 1 до 10 см³ экстракта, полученного по п. 5.3.5, довести объем водой до 10 см³ и титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 15–20 с.

Одновременно провести контрольное испытание на содержание в продукте редуцирующих веществ. Для этого в колбу поместить такой же объем экстракта, прибавить равный ему объем ацетатного буферного раствора, раствор формальдегида в объеме, равном половине объема буферного раствора, перемешать и выдержать в течение 10 мин, закрыв предварительно колбу пробкой. Затем содержимое титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия.

За результат титрования принять среднее арифметическое результатов двух титрований одного экстракта. При повторном титровании в области предполагаемой точки эквивалентности раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия прибавлять по 1–2 капли.

Массовую долю аскорбиновой кислоты в процентах вычислить по формуле:

$$X_1 = \frac{(V_1 - V_2) \cdot T \cdot V_3 \cdot 100}{V_4 \cdot m}, \quad (5.2)$$

где V_1 – объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованный на титрование экстракта пробы, см³; V_2 – объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованный на контрольное испытание, см³; V_3 – объем экстракта, полученный при экстрагировании витамина С из навески продукта, см³; V_4 – объем экстракта, используемый для титрования, см³; T – титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, г/см³; m – масса навески продукта, г.

5.3.7 Определение содержания аскорбиновой кислоты в растительных объектах методом визуального титрования с использованием цистеина

От 10 до 20 см³ экстракта пипеткой прилить в мерную колбу вместимостью 50 см³. Одновременно в стакан вместимостью 50 см³ внести такой же объем экстракта и прилить порциями раствор фосфорнокислого калия двузамещенного до установления рН 7,0–7,5, измеряя его с помощью рН-метра. Отметить объем раствора фосфорнокислого калия. После этого в колбу с экстрактом внести 50 мг цистерна или его раствор, перемешать до растворения и прибавить установленный объем фосфорнокислого калия. Колбу закрыть пробкой и выдержать в термостате при 37 °С в течение 30 мин. После этого раствор в колбе охладить, подкислить раствором серной кислоты до рН, близкого к нулю, и снова охладить. Необходимый для подкисления объем серной кислоты также установить предварительно, пользуясь рН-метром, используя для этого стакан с экстрактом после прибавления в него фосфорнокислого калия. Раствор в колбе довести до метки экстрагирующим раствором и перемешать.

В колбу вместимостью 50 см³ внести пипеткой от 10 до 20 см³ полученного раствора, прибавить 2–3 см³ раствора формальдегида, закрыть крышкой и выдержать 8 мин, прилить раствор метафосфорной кислоты до объема 30 см³. Затем титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия.

За результат титрования принять среднее арифметическое результатов двух титрований одного раствора.

Массовую долю витамина С в процентах вычислить по формуле:

$$X_2 = \frac{V_1 \cdot T \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot 100}{V_4 \cdot V_5 \cdot m}, \quad (5.3)$$

где V_1 – объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованный на титрование, см³; V_2 – объем экстракта, полученный при экстрагировании витамина С из навески продукта, см³; V_3 – объем раствора, полученный после восстановления, см³; V_4 – объем экстракта, используемый для восстановления, см³; V_5 – объем раствора, используемый для титрования, см³; T – титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, г/см³; m – масса навески продукта, г.

5.3.8 Определение содержания аскорбиновой кислоты в растительных объектах фотометрическим методом

Приготовление полунасыщенного раствора гидрохинона

1 г гидрохинона растворить в 10 см³ ацетона и профильтровать. Полунасыщенный раствор гидрохинона приготовить смешиванием одного объема насыщенного раствора с таким же объемом ацетона.

Построение градуировочного графика

Приготовить пять растворов. Для этого в центрифужные пробирки или делительные воронки внести: в первую – 5,0 см³ экстрагирующего раствора кислот, в остальные последовательно по 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 см³ раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия и добавить экстрагирующий раствор до объема 5,0 см³. Во все пробирки или делительные воронки прибавить по 5 см³ ацетатного буферного раствора, перемешать и затем прибавить по 10 см³ органического растворителя. Пробирки или делительные воронки закрыть пробками и содержимое перемешать в течение 10 с.

Пробирки центрифугировать, а воронки оставить в покое до разделения слоев. Органический слой перенести в кювету с расстоянием между рабочими гранями 10 мм и измерить его оптическую плотность при длине волны 500 нм. В качестве контрольного раствора сравнения использовать чистый растворитель. По полученным данным построить график зависимости оптической плотности органического экстракта 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия от объема раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия в кубических сантиметрах. Построение градуировочного графика проводить для каждого свежеприготовленного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия.

Проведение испытания

В центрифужную пробирку или делительную воронку внести пипеткой от 1 до 5 см³ экстракта испытуемой пробы, добавить экстрагирующего раствора до

объема 5 см³, такой же объем ацетатного буферного раствора и раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия в объеме не более 2 см³. Перемешать и прибавить 10 см³ органического растворителя. Далее испытание провести аналогично построению градуировочного графика. При получении мутного органического экстракта перед измерением оптической плотности экстракт профильтровать через фильтровальную бумагу.

Одновременно провести контрольное испытание на содержание в продукте редуцирующих веществ. Для этого в центрифужную пробирку или делительную воронку внести такие же объемы экстракта и ацетатного буферного раствора, как при испытании исследуемой пробы, прибавить раствор формальдегида в объеме, равном половине объема буферного раствора, перемешать и выдержать в течение 10 мин. После этого прибавить раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, снова перемешать и прибавить 10 см³ органического растворителя. Затем продолжить испытаний аналогично построению градуировочного графика.

При содержании в продукте растворимых в органическом растворителе красящих веществ их влияние определить следующим образом: после проведения испытания в кювету с органическим экстрактом прибавить две капли насыщенного раствора гидрохинона, перемешать палочкой, выдержать 30 с и снова измерить оптическую плотность. Полученное значение оптической плотности вычесть из начального значения оптической плотности органического экстракта.

Массовую долю витамина С в процентах вычислить по формуле:

$$X_3 = \frac{(V_1 - V_2 - V_3) \cdot T \cdot V_4 \cdot 100}{V_5 \cdot m}, \quad (5.4)$$

где V_1 – объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованный на проведение испытания, см³; V_2 – объем избытка раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, найденный по градуировочному графику, см³; V_3 – объем дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованный на контрольное испытание, см³; V_4 – объем экстракта, полученный при экстрагировании витамина С из навески продукта, см³; V_5 – объем экстракта, используемый для испытания, см³; T – титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, г/см³; m – масса навески продукта, г.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Сравнить результаты определения содержания аскорбиновой кислоты в растительном сырье, полученные разными методами; сформулировать выводы.

Вопросы для самоконтроля

1. В каких продуктах в наибольшем количестве содержится витамин С?
2. Назовите функции витамина С в организме.
3. Опишите методики определения аскорбиновой кислоты в растительном материале.
4. К чему приводит нехватка витамина С в организме?
5. К чему приводит переизбыток витамина С в организме?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Цель работы: определить содержание α -, β - и γ -целлюлозы в целлюлозо-содержащем сырье: соломе, кукурузной кочерыжке, подсолнечной лузге, рисовой лузге.

6.1 Теоретические положения

Целлюлоза, клетчатка (фр. cellulose от лат. cellula – «клетка») – органическое соединение, углевод, полисахарид с формулой $(C_6H_{10}O_5)_n$. Молекулы представляют собой неразветвлённые цепочки из остатков β -глюкозы, соединённых гликозидными связями β -(1 \rightarrow 4) (рисунок 6.1). Белое твёрдое вещество, нерастворимое в воде. Главная составная часть клеточных оболочек всех высших растений. Целлюлоза является одним из основных компонентов клеточных стенок растений, хотя её содержание в различных клетках или даже частях стенки одной клетки сильно варьируется [12].

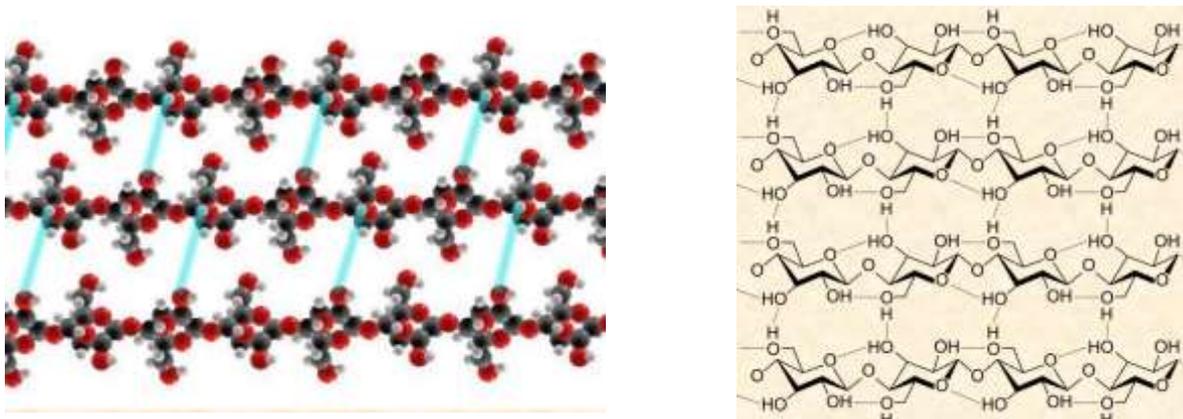


Рисунок 6.1 – Тройная нить целлюлозы (показаны водородные связи между молекулами целлюлозы)

Показателем, определяющим пригодность целлюлозы для производства вискозного волокна, является содержание α -целлюлозы.

α -Целлюлозой условно называют часть целлюлозы, не растворимую в 17,5%-ной NaOH при 20 °С. Она не является индивидуальным химическим соединением. Это чисто техническое понятие, позволяющее судить о пригодности целлюлозы для тех или иных промышленных целей, характеризующее степень деструкции (т. е. степень разрушения) технической целлюлозы. Считают, что в 17,5%-ной щелочи не растворяются молекулы целлюлозы большой длины, наиболее длинные молекулы маннана и ксилана, совместно ориентированные с целлюлозой гемицеллюлозы и некоторая часть остаточного лигнина.

В раствор переходит низкомолекулярная фракция целлюлозы, а также гемицеллюлозы (со степенью полимеризации ниже 200). Гемицеллюлозы – это растительные гомо- и гетерополисахариды с меньшей, чем у целлюлозы, молекулярной массой (10000–40000), состоящие из остатков разных пентоз и гексоз.

Основные компоненты гемицеллюлоз – глюкоаны, ксиланы, маннаны, галактаны, фруктозаны, арабиногалактаны и т.д. (рисунок 6.2). Больше всего в растениях содержится ксиланов. Много гемицеллюлоз в семенах, косточках, соломе, подсолнечной лузге, шелухе семян хлопчатника, кукурузной кочерыжке. В среднем гемицеллюлозами представлено около 25 % (по массе) органического вещества однолетних растений [13].

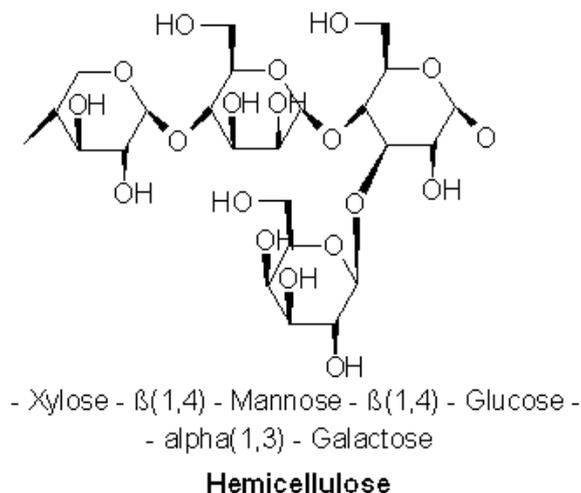


Рисунок 6.2 – Типичные компоненты гемицеллюлоз и связи между ними

Фракцию целлюлозы, переходящую в щелочной раствор, но способную высаживаться при подкислении уксусной кислотой, называют β -целлюлозой, а фракцию, остающуюся в растворе, – γ -целлюлозой. Последнюю определяют по разности.

β -целлюлоза представляет собой главным образом низкомолекулярную разрушенную целлюлозу. В древесине она, по-видимому, не содержится, а образуется во время варки и отбелки. Во фракции β -целлюлозы также содержатся и полисахариды неглюкозного характера.

γ -целлюлоза – это низкомолекулярная фракция гемицеллюлоз с примесью продуктов распада целлюлозы.

6.2 Задание:

1. Определить массовую долю влаги в исходном целлюлозосодержащем сырье: соломе, кукурузной кочерыжке, подсолнечной лузге, рисовой лузге.
2. Выделить α -целлюлозу из целлюлозосодержащего сырья и определить ее содержание.
3. Выделить β - и γ -целлюлозу (суммарно) из целлюлозосодержащего сырья и определить их общее содержание.
4. Выделить γ -целлюлозу из целлюлозосодержащего сырья и определить ее содержание.
5. Определить содержание β -целлюлозы расчетным путем.

6.3 Порядок выполнения работы

Материалы и реактивы: солома, кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, рисовая лузга, 9,5%-ный и 17,5%-ный растворы едкого натра, дистиллированная вода, фенолфталеин, 0,1 н. раствор бихромата калия, 0,1 н. раствор тиосульфата натрия, 10%-ный раствор калия йодистого, 40%-ный раствор аммония сернокислого, 5%-ный раствор крахмала, 1 н. раствор серной кислоты, концентрированная серная кислота.

Оборудование, лабораторная посуда: весы аналитические, толстостенный стеклянный стакан (200 см³), стеклянная палочка, фильтр Шотте № 4, вакуумный насос Комовского, колба Бюхнера, стеклянные бюксы, пробирки, мерная колба на 1 дм³, пипетки лабораторные, колбы конические, бюретка на 50 см³, цилиндр на 50 см³, бумажный фильтр «синяя лента».

Ход работы:

6.3.1 Определение влажности целлюлозосодержащего сырья

В доведенные до постоянной массы стеклянные бюксы поместить навеску целлюлозосодержащего сырья (0,4–0,5 г), взвесить на аналитических весах. Открытые бюксы с навесками поместить в сушильный шкаф и оставить сушиться в течение 2 ч при температуре 105 °С. Затем бюксы с навесками закрыть крышками, перенести в эксикатор с хлористым кальцием, оставить охлаждаться при комнатной температуре 40 мин и взвесить. Повторить эксперимент, высушивая образец до постоянной массы ($\pm 0,0001$ г). Массовую долю влаги рассчитать по формуле:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \cdot 100, \quad (6.1)$$

где m_1 – масса бюкса с навеской до высушивания, г; m_2 – масса бюкса с навеской после высушивания, г; m – масса доведенного до постоянного веса бюкса, г.

6.3.2 Выделение и определение содержания α -целлюлозы

Навеску 3 г измельченного воздушно-сухого целлюлозосодержащего сырья поместить в толстостенный стеклянный стакан емкостью 200 см³. Залить навеску 45 см³ 17,5%-ного раствора едкого натра. Сначала прилить 15 см³ раствора NaOH, осторожно перемешивая содержимое стакана стеклянной палочкой. Через 3 мин при перемешивании влить оставшиеся 30 см³ раствора щелочи. Стакан с полученной смесью накрыть стеклом и оставить на 45 мин. По истечении указанного времени к реакционной смеси прилить 50 см³ дистиллированной воды и тщательно перемешивать в течение 2 мин. Затем содержимое стакана перенести на фильтр Шотте, равномерно распределить по поверхности и отфильтровать в колбу Бюхнера насосом Комовского.

Остаток на фильтре сначала тщательно промыть 9,5%-ным раствором щелочи (3 раза по 25 см³). Далее остаток промыть дистиллированной водой до отрицательной реакции на фенолфталеин. Для этого по мере промывки водой отбирать в пробирку несколько капель фильтрата и добавлять в нее каплю фенолфталеина. При отрицательной реакции на щелочь промывку закончить.

Остаток максимально перенести с фильтра Шотте в высушенный до постоянной массы бюкс и сушить в сушильном шкафу 5–6 ч при температуре 100 °С. После этого бюкс перенести в эксикатор, охладить и взвесить. Процедуру сушки проводить до постоянства массы бюкса.

Содержание α -целлюлозы в процентах рассчитать по формуле:

$$A_1 = \frac{(m_1 - m) \cdot 100}{m_2 \cdot (100 - W)} \cdot 100, \quad (6.2)$$

где m_1 – масса бюкса с высушенной α -целлюлозой, г; m_2 – навеска воздушно-сухого целлюлозосодержащего сырья, г; m – масса высушенного бюкса, г; W – влажность целлюлозосодержащего сырья, %.

6.3.3 Выделение и определение общего содержания β - и γ -целлюлозы

Фильтрат и промывные воды, полученные в п. 6.3.2, собрать в мерную колбу на 1 дм³. Объем колбы довести до метки дистиллированной водой. Взять пипеткой аликвоту 25 см³ и внести в коническую колбу на 250 см³. Затем в коническую колбу добавить из бюретки 50 см³ 0,1 н. раствора бихромата калия и, осторожно помешивая, влить цилиндром 35 см³ концентрированной серной кислоты. Полученную смесь кипятить на электрической плитке в течение 3 мин, охладить и количественно перенести в колбу на 750 см³. Далее добавить 10 см³ 10%-ного раствора иодида калия для определения избытка бихромата калия. Колбу с полученной смесью оставить на 5 мин в темном месте до окончания химической реакции. Выделившийся йод оттитровать 0,1 н. раствором тиосульфата натрия до перехода синей окраски раствора в бирюзово-зеленую. Параллельно провести «холостой опыт», вводя те же реагенты, кроме щелочного раствора целлюлозы (вместо него – 25 см³ дистиллированной воды).

Общее содержание β - и γ -целлюлозы в процентах рассчитать по формуле:

$$A_2 = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,000685 \cdot 1000 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)}, \quad (6.3)$$

где V_1 – объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование «холостой пробы», см³; V_2 – объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование щелочного раствора гемицеллюлоз, см³; m – исходная навеска воздушно-сухого целлюлозосодержащего сырья, г; W – влажность целлюлозосодержащего сырья, %; 0,000685 – количество гемицеллюлоз, практически окисляемых 1 см³ 0,1 н. раствора бихромата калия.

6.3.4 Выделение и определение содержания γ -целлюлозы

В коническую колбу на 250 см³ пипеткой внести 25 см³ анализируемого раствора гемицеллюлоз и титровать в присутствии фенолфталеина 1 н. серной кислотой. При этом на титрование расходуется V мл серной кислоты. В другую коническую колбу на 250 см³ внести 25 см³ щелочного раствора гемицеллюлоз, добавить $(V - 1)$ мл 1 н. серной кислоты и 1,5 см³ 40%-ного раствора сульфата аммония. Колбу с содержимым нагревать на водяной бане (80 °С) в течение

15 мин, затем охладить. После охлаждения прилить 1 см³ 1 н. серной кислоты и отфильтровать содержимое колбе на фильтре «синяя лента». Осадок на фильтре промыть несколько раз горячей дистиллированной водой. В колбу добавить из бюретки 50 см³ бихромата калия и осторожно при помешивании 35 см³ концентрированной серной кислоты. Дальнейшие процедуры выполнять аналогично методике определения общего содержания β- и γ-целлюлоз.

Содержание γ-целлюлозы в процентах рассчитать по формуле:

$$A_3 = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,000685 \cdot 1000 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)}, \quad (6.4)$$

где V_1 – объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование «холостой пробы», см³; V_2 – объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование щелочного раствора гемицеллюлоз, см³; m – исходная навеска воздушно-сухого целлюлозосодержащего сырья, г; W – влажность целлюлозосодержащего сырья, %; 0,000685 – количество гемицеллюлоз, практически окисляемых 1 см³ 0,1 н. раствора бихромата калия.

6.3.5 Определение содержания β-целлюлозы

Содержание β-целлюлозы в процентах рассчитать по формуле:

$$A_4 = A_2 - A_3 \quad (6.5)$$

Результаты работы оформить в виде таблицы 6.1.

Таблица 6.1 – Сравнительный анализ содержания гемицеллюлоз в целлюлозосодержащем сырье различного происхождения

Вид сырья	Содержание гемицеллюлоз, %		
	α-	β-	γ-
Солома			
Кукурузная кочерыжка			
Подсолнечная лузга			
Рисовая лузга			

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение целлюлозы и гемицеллюлоз.
2. Назовите основные компоненты гемицеллюлоз.
3. Каковы функции целлюлозы в живой клетке.
4. Что представляют собой α-, β- и γ-целлюлозы?
5. Опишите методику определения фракционного состава целлюлозосодержащего сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антиоксидантная активность настоев чая / А. А. Федосеева и др. // Химия растительного сырья. – 2008. – № 3. – С. 123–127.
2. Беляева, Л. А. Биохимия растений: тексты лекций по разделу «Растительные вещества вторичного происхождения» для студентов биологического факультета / Л. А. Беляева. – Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2009. – 108 с.
3. Запрометов, М. Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях / М. Н. Запрометов. – Москва: Наука, 1993.
4. Кузьменко, И.Н. Лекарственные и ядовитые растения: учеб. пособие / И. Н. Кузьменко, Н. Л. Колясникова. – Пермь: ИПЦ «ПрокростЪ», 2019. – 104 с.
5. Budryn, G. Binding of red clover is flavones to actin as a potential mechanism of anti-metastatic activity restricting the migration of cancer cells / G. Budryn, J. Grzelczyk, H. Perez-Sanchez // *Molecules* (Basel, Switzerland). – 2018. – № 23 (10). – P. 2471.
6. Efficacy of *Panax ginseng* supplementation on blood lipid profile. A meta-analysis and systematic review of clinical randomized trials / D. Hernandez-Garcia, A. B. Granado-Serrano, M. Martin-Gari, A. Naudi, etc. // *J Ethnopharmacol.* – 2019. – № 243. – P. 112090.
7. Федосеева, Г. М. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды: метод. пособие по фармакогнозии / Г. М. Федосеева, В. М. Минович, Е. Г. Горячкина. – Иркутск, 2009. – 67 с.
8. Компанцев, Д. В. Белковые изоляты из растительного сырья: обзор современного состояния и анализ перспектив развития технологии получения белковых изолятов из растительного сырья / Д. В. Компанцев, А. В. Попов, И. М. Привалов, Э. Ф. Степанова // *Современные проблемы науки и образования.* – 2016. – № 1. – С. 58.
9. Пелевина, А. И. Зернобобовые культуры – решение проблемы белка / А. И. Пелевина // *Международный журнал гуманитарных и естественных наук.* – 2017. – Т. 1, № 3. – С. 44–46.
10. Канюков, В. Н. Витамины: учеб. пособие / В. Н. Канюков, А. Д. Стрекаловская, Т. А. Санеева. – Оренбург: ОГУ, 2012. – 108 с.
11. Смирнов, В. А. Витамины и коферменты: учеб. пособие: в 2 ч. / В. А. Смирнов, Ю. Н. Климочкин. – Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2008. – Ч. 2. – 91 с.
12. Терентьева, Э. П. Химия древесины, целлюлозы и синтетических полимеров: учеб. пособие: в 2 ч. / Э. П. Терентьева, Н. К. Удовенко, Е. А. Павлова. – Санкт-Петербург: СПбГТУРП, 2014. – Ч. 1. – 53 с.
13. Структура и физико-химические свойства целлюлоз и нанокompозитов на их основе / под ред. Л. А. Алешиной, В. А. Гуртова, Н. В. Мелех. – Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2014. – 240 с.

Локальный электронный методический материал

Любовь Сергеевна Дышлюк

**СЫРЬЕ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Редактор Е. Билко

Уч.-изд. л. 2,7. Печ. л. 2,3

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