

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАНА
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

УДК

САФАЕВА НИГОРАХОН ЗАБИХУЛЛАЕВНА

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕКТИНА ИЗ ПЛОДО-ОВОЩНЫХ ОТХОДОВ

Специальность 5А522904 "Биотехнология пищевых продуктов и кормов "

На соискание академической степени

магистра

ДИССЕРТАЦИЯ

Научный руководитель _____ к.б.н. доц. Р.М.Артикова

Диссертационная работа была

заслушана на заседании кафедры "Биотехнологии" рекомендована к публичной защите.

Зав. Кафедрой _____ д.х.н., проф. М.С.Тошмухамедов

Разрешена к защите:

« ____ » _____ 201 г.

Декан магистратры _____ к.т.н. доц. К.Г.Мухаммедов

Ташкент – 2012

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАНА
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

УДК

САФАЕВА НИГОРАХОН ЗАБИХУЛЛАЕВНА

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕКТИНА ИЗ ПЛОДО-ОВОЩНЫХ ОТХОДОВ

Специальность 5А522904 "Биотехнология пищевых продуктов и кормов "

На соискание академической степени

магистра

ДИССЕРТАЦИЯ

Научный руководитель _____ к.б.н. доц. Р.М.Артикова

Ташкент – 2012

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ОБОСНОВАНИЕ И АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.....	8
ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	10
ГЛАВА I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	
История пектина.....	11
1.2. Строения и структуры пектиновых веществ.....	12
1.3. Изучение молекулярно-массовых и конформационных характеристик пектиновых веществ.....	20
1.4. Исследование степени этерификации.....	23
1.5. Способы получения пектинов.....	25
1.6. Биологическая активность пектинов.....	29
1.7. Производство пектина.....	32
1.8. Применение пектиновых веществ.....	34
ГЛАВА II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	
2.1. Условия проведения эксперимента.....	41
2.2. Основные объекты проводимого эксперимента.....	45
2.3. Методика проведения эксперимента.....	46
ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Выделение пектиновых веществ из виноградных и яблочных выжимок.....	47
3.2. Гидролиз пектиновых веществ	48
3.3. Определение титрометрических показателей ПВ.....	51
3.4. Определение показателя вязкости.....	52
3.5. ИК-спектроскопия.....	53
3.6. Физико-химические свойства виноградных и яблочных выжимок.....	57
ВЫВОДЫ.....	59
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	60
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	63

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонно и в ощутимой степени возрастают авторитет и позиции Узбекистана на международной экономической арене. Тщательная разработка руководителем государства Исламом Каримовым стратегии социально-экономического развития, точное и правильное определение путей реализации целей и задач экономических реформ создали предпосылки для достижения весомых результатов на пути к главной цели.

В настоящее время социально-экономическое развитие государств мира по содержанию в корне отличается от предыдущих этапов прогресса. Главным и важнейшим аспектом этого является усиление интеграции и глобализации национальных экономик.

Отмечая итоги работы в сельском хозяйстве, показано, что несмотря на значительные проблемы и трудности, созданные сложными погодными и климатическими условиями, благодаря самоотверженному труду тружеников села в истекшем году не только выполнены, но и перевыполнены договорные обязательства по государственным закупкам важнейших сельскохозяйственных культур.

Собрано 6 миллионов 800 тысяч тонн зерна, почти 3,5 миллиона тонн хлопка, свыше 8,2 миллиона тонн овощей и бахчевых, около 3 миллионов тонн садоводческой продукции, произведено 6,6 миллиона тонн молока, свыше 1,5 миллиона тонн мяса, более 3,5 миллиарда штук яиц.

Так, по пищевой промышленности в 2011 году (по сравнению с 2010 годом) прирост ликеро-водочных изделий составил 105,6 %, коньяка – 125 %, безалкогольных напитков – 108,3 %, минеральных вод – 129,4%. Производство винограда в 2011 году составило 608 тыс. тонн, что по сравнению с 2010 годом увеличилось на 109,2 % [1].

В настоящее время ухудшение экологической обстановки связано с тем, что ежегодно в окружающую среду вводятся десятки тысяч веществ, характеризующихся токсическими свойствами для человека и влияющих на изменение пищевого статуса населения. В организм человека с

водой и пищей поступает значительная часть веществ, обладающих канцерогенным и мутагенным действием.

Государственная политика направлена на то, чтобы снизить количество токсикантов в окружающей среде и уменьшить их проникновение в организм человека, в том числе и с продуктами питания. В этой связи использование пектиновых веществ как природных детоксикантов остается актуальным. Очевидно, что получение безопасных и биологически активных продуктов заключается в разработке оптимальных технологий не только в процессе переработки сырья» но и при его выращивании в условиях минимизации воздействия на него факторов, способных вызвать токсикацию тканей уже на этом этапе,

Для соблюдения перечисленных требований при выращивании и переработке растений с целью получения пектина большое значение имеют методы контроля конечного продукта. Совершенствование этих методов позволяет с учетом физико-химических показателей целевого продукта контролировать его качество на этапах выращивания, промежуточной переработки и при получении конечных оценочных характеристик.

Пектиновые вещества - это высокомолекулярные соединения углеводной природы. Главным компонентом пектиновых веществ является полигалактуроновая кислота, часть карбоксильных групп которой этерифицирована метоксильными группами. Степень этерификации или метоксилирования является важным показателем пектина и выражается отношением количества метоксилированных групп к их общему количеству в пектиновых веществах. Пектиновые вещества со степенью метоксилирования больше 50 % относят к высокометоксимирированным, со степенью метоксилирования меньше 50 % - низкометоксилированным. Гидроксильные группы пектина могут быть частично ацетилированы. Содержание ацетильных групп в количестве более – 1 % понижает студнеобразную способность пектина. Кроме полигалактуроновой кислоты в составе пектиновых веществ обнаружены полисахариды арабинан и галактан, а также

моносахара рамноза, галактоза, арабиноза, ксилоза [5].

В клеточных стенках растений пектин содержится в виде протопектина, химически связанного с фибриллами целлюлозы и гемицеллюлозами. Роль пектиновых веществ заключается в том, что вместе с гемицеллюлозами они образуют матрикс клеточной оболочки, скрепляющей фибриллы целлюлозы в жесткую структуру [7]. Пектиновые вещества, выделенные из растений, представляют собой порошки серого, бежевого или светло-коричневого цвета, без запаха, кисловатые на вкус. В присутствии воды они набухают, в избытке воды растворяются. Водные растворы пектиновых веществ довольно вязкие [2]. Пектин нерастворим в органических растворителях. Он может быть осажден из водных растворов добавлением смешивающихся с водой растворителей - метанола, этанола, изопропанола, ацетона.

Весьма ценным в практическом отношении свойством пектиновых веществ является их способность образовывать студни в присутствии сахара, кислоты, ионов металлов. В процессе желирования нитевидные молекулы пектина образуют трехмерный каркас [4]. С увеличением молекулярной массы и степени метоксилирования студнеобразующая способность пектина возрастает. Высокометоксилированный пектин образует студни в присутствии кислоты и при большом содержании сахара (55 - 65 %), низкометоксилированный - при низком содержании сахара (20 - 30 %) и при добавлении солей поливалентных металлов, например кальция [1].

Степень метоксилирования пектиновых веществ влияет и на скорость студнеобразования. Высокометоксилированные пектин с высокой скоростью образования студня используется в консервной промышленности для приготовления конфитюров, джемов и других продуктов с содержанием сухих веществ 50 - 60 %.

Пектиновые вещества содержатся в клеточных оболочках всех высших растений, но традиционно для получения пектина используют различные отходы перерабатывающих производств агропромышленного комплекса.

Сырьем для получения пектина являются кожура цитрусовых, яблочные и виноградные выжимки, свекловичный жом, корзинки подсолнечника, хлопковый шрот, кормовые арбузы, смородина, рябина, кожура картофеля, кора сосны, мякоть айвы, луковая шелуха, отходы кофе, ячменя, морских трав и т.д. [3-5].

На сегодняшний день, в виноделии, консервной промышленности и других отраслях пищевой промышленности Узбекистана (перерабатывающих плодородное сырье), вторичные ресурсы для производства пектина используются крайне неудовлетворительно. Это связано с целым рядом причин, и в первую очередь с отсутствием высокоэффективных экологически чистых технологий получения пектина.

Современные экономические отношения, складывающиеся в сфере производства, способствуют внедрению новых технологий рационального использования первичных сырьевых ресурсов, комплексной переработки и безотходной утилизации вторичных сырьевых ресурсов на основе достижений науки и техники. Это обеспечит выпуск высококачественной, конкурентоспособной продукции по низким ценам.

Повышение эффективности использования вторичных ресурсов производства, в частности, отходов плодородного виноделия и консервной промышленности, с целью получения ценного пищевого продукта - пектина, на основе безотходных экологически чистых технологий, является важной и актуальной проблемой.

Первое связано с применением пектина в качестве желирующей добавки в пищевой промышленности. и др.

Несколько позднее получило распространение новое направление, основанное на протекторных свойствах пектина, связанных с функциональной активностью молекул галактуроновой кислоты. Обострение экологических проблем определило использование детоксицирующих свойств пектина в ряде задач по обеспечению статуса пищевой безопасности населения. Кроме того, пектиновые вещества используются в промышленном и аграрном секторе в

качестве добавок в кремы и микробиологические среды, как консерванты почвы и в других целях .

Научные разработки этих направлений, подтверждаемые практическими результатами, должны закономерно привести к организации производства пектина и пектинопродуктов на территории, где в них высока потребность и существует достаточная сырьевая база.

Продолжает оставаться актуальным вопрос получения высокоочищенных пектинов, в том числе и низкометоксилированных. Ранее существовавшие мощности по получению пектинов, в силу нарушения межреспубликанских связей, были ликвидированы и не восстановлены до сих пор. Ситуация может измениться в том случае, если будут созданы эффективные высокотехнологичные производства, позволяющие получать высококачественный пектин из местного сырья.

Производство пектина может базироваться только на критериях комплексного подхода в решении научных, производственных и экономических вопросов по организации рынка сбыта пектина и пектинопродуктов. Для такого замкнутого цикла решения проблемы актуальным является дальнейшая разработка новых видов пектино содержащих продуктов и расширение области его агропромышленного использования.

ОБОСНОВАНИЕ И АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

В настоящее время в ряду актуальных проблем - рациональное использование первичных сырьевых ресурсов, комплексная переработка и безопасная утилизация вторичных сырьевых ресурсов. Для ее решения требуются наращивание производственной базы перерабатывающей отрасли, а также улучшение использования сырья путем разработки и создания новых прогрессивных, энергоресурсосберегающих технологий комплексной переработки ценных вторичных сырьевых ресурсов на основе последних достижений науки и техники.

Одной из важных народнохозяйственных проблем увеличение выпуска пектина из различных видов растительного сырья, так как в настоящее время потребность в пектине намного превосходит его промышленное производство. Мировое производство пектина за последние составляет 24 тыс. тон. в год.

Вместе с тем встает необходимость повышения качества продукции, увеличения её ассортимента в связи с возрастающими требованиями народного хозяйства. Все большую остроту приобретает вопросы поиска новых сырьевых ресурсов и разработки безотходного экологически чистого производства пектина.

Несмотря на то, что химия и технология пектина достаточно подробно изучается более 200 лет, из-за сложности структуры и неоднородности химического состава пектина в различных видах растительного сырья, а также из-за трудности выделения в нативном виде, многие вопросы, связанные с установлением экстрагирования, концентрирования, осаждения и сушки в зависимости от вида сырья являются в настоящее время актуальными задачами.

Вышеизложенные обстоятельства определяют необходимость исследований технологических процессов получения высококачественных пектиновых веществ в зависимости от способов получения и технологических параметров, используемых в процессе выделения.

Развития промышленности, особенно химической, нефтехимической, фармацевтической, атомной, а также всех отраслей машиностроения привело к резкому ухудшению экологической обстановки. С каждым годом растет загрязнение окружающей среды различными промышленными выбросами, выхлопными газами транспорта, содержащими соли тяжелых металлов, радионуклиды и другие токсичные для животного и растительного мира вещества.

Пектин обладает способностью связывать эти вещества и выводить их из организма. На этом принципе основано использование пектина в качестве добавки в различные продукты лечебного и профилактического назначения, а также для изготовления лекарственных средств.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью настоящей магистерской диссертационной работы являлась разработка технологии получения пектинов из различных видов сырья (из выжимков яблоки и винограда) на основе комплексного изучения особенностей физико-химических показателей сухого пектина.

В задачи исследования входило:

- выделение пектиновые вещества из яблочных и виноградных выжимок ;
- гидролизовать пектиновых веществ методом кислотного гидролиза и установить моносахаридный состав;
- Определить вязкости виноградных и яблочных пектинов по методу Освальда;
- установить строение изучаемых ПВс помощью метода ИК –спектроскопии;
- проведение сравнительных исследований физико-химических свойств пектинов, выделенных из полученных концентратов, и их качественных характеристик.;

ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. История пектина

В 1990 г. исследователи пектина могли отметить двухсотлетие его открытия. В 1790 г. ученый Ваклен (Vauquelin) выделил из фруктового сока водорастворимое вещество, обладающее гелеоб-разующей способностью. Через 40 лет Браконно (Brasconnot) назвал его пектиновой кислотой (от греческого "pektos"- свернувшийся, застывший). В 1924 г. Смоленский первым предположил, что пектин состоит из остатков D-галактуроновой кислоты, соединенных через α -1,4-гликозидную связь в полимерную цепочку. В 1930 г. Майер (Meier) и Марк (Mark) подтвердили это предположение, экспериментально доказав существование полимерной молекулы пектина. В 1937 г. Шнайдер (Schneider) и Бокк (Bock) впервые установили структурную формулу пектина, однако промышленное производство высоко-коэтерифицированного пектина было начато только 50, а низкок-терифицированного - 26 лет назад. Неудивительно, что пектин впервые выделили из фруктового сока: это соединение содержится в большом количестве в ягодах, фруктах, клубнях и стеблях растений. Он локализован в первичной клеточной стенке всех высших растений. Через боковые цепочки пектин соединен с волокнами целлюлозы и рядом других гетерополисахаридов, которые относятся к соединениям типа гемицеллюлозы.

Содержание этого вещества в клеточной стенке максимально в центральном слое, связывающем клетки между собой. Молекулы сахара рамнозы, соединенные с молекулой пектина, придают полимерной цепочке зигзагообразный вид. Наличие рамнозы в молекуле пектина обосновывает его другое более правильное название - рамногалактуронан. Другие нейтральные сахара - арабам, галактан и ксилоглюкан - образуют боковые цепочки, соединяющиеся с молекулами целлюлозы. Морфологическая и физиологическая роль пектина в растениях, как структурного элемента

клетки, состоит в регулировании водного обмена растений.

В зависимости от количества замещенных корбоксильных групп пектин может обладать различной степенью этерификации. Если более 50% корбоксильных групп содержат остатки метилового спирта, то это высокоэтерифицированные пектины, если степень этерификации ниже 50% - низкоэтерифицированные. Они имеют разные механизмы желирования: первые образуют гели в присутствии сахара и кислоты, при этом содержание сухих веществ в среде должно быть не менее 50%, а pH 2,8...3,4. При одинаковых условиях и высоких температурах высокоэтерифицированные пектины желируют быстрее, чем низкоэтерифицированные. Время и температура желирования - важные критерии качества высокоэтерифицированных пектинов.

1.2. Строения и структуры пектиновых веществ

Пектины биополимеры являются объектами многочисленных исследований [1-3]. Хотя пектины открыты более 200 лет назад, их состав и строение и до настоящего времени нельзя считать окончательно установленными. Исследование строения и структуры пектина представляет большие трудности вследствие изменения пектина в процессе извлечения из растений и даже при хранении и первичной переработке растительного сырья, а также наличия примесей, сопутствующих основным соединениям.

Согласно сформировавшимся к настоящему времени представлениям, молекула пектина состоит главным образом из остатков галактуроновой кислоты (GalA). Рамноза (Rha) минорный компонент скелета пектина, а другие нейтральные сахара, такие как арабиноза (Ara), галактоза (Gal) и ксилоза (Xyl), обнаружены в боковых цепях. Установлено, что типичным фрагментом является цепь из нескольких сотен единиц GalA, связанных α -(1→4)-гликозидными связями и имеющих различную степень этерификации (СЭ). Известно, что пектин обладает способностью образовывать водные гели, и это свойство широко используется в пищевой промышленности [15].

Среди многих особенностей строения пектина наибольшее влияние на его желирующие свойства оказывает величина СЭ. В соответствии с желирующей способностью пектины делятся на две группы высокоэтерифицированные, способные образовывать гели, и низкоэтерифицированные, желеобразующая способность которых значительно ниже. Поэтому оценка степени этерификации у различных образцов пектина, позволяющая коррелировать ее с желирующими свойствами пектина и его гелей, и, следовательно, определять его пригодность для нужд пищевой промышленности, имеет большую коммерческую значимость.

Состав и структура пектиновых полисахаридов из традиционного сырья продолжает оставаться предметом углубленного изучения с применением широких возможностей современных методов исследования. Пектиновые полисахариды и их отдельные фрагменты легко разлагаются в результате химического гидролиза и действия энзимов. Последний способ в силу строгой специфичности действия энзимов становится аналитическим инструментом при исследовании структуры пектинов.

Предложена общая модель для яблочных, цитрусовых и свекловичных пектинов, характеризующихся чередующейся линейной ("гладкой") (1→4)-галактуронановой цепью и разветвленной ("волосатой") областью, содержащей большинство нейтральных Сахаров. Оригинальные пектины из этих источников отличаются по молекулярной массе (цитрусовый > яблочный > свекловичный) и содержанию рамнозы (свекловичный > яблочный > цитрусовый). Из этих трех типов пектинов выделен гомогалаууронан со степенями полимеризации 72-120, 91-108, 114-138 для яблочного, свекловичного и цитрусового соответственно.

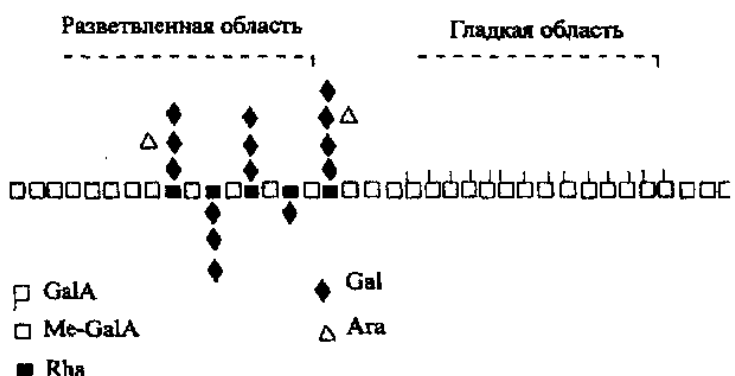
Универсальный пектин из яблочных выжимок, цитрусовой кожуры и сахарной свеклы имеет ровную шмогалактуроновую область наряду с разветвленной областью. Последняя богата нейтральными сахарами, главным образом арабинозой, галактозой и рамнозой. Установлена различная чувствительность (лабильность) по отношению к кислотному гидролизу

гликозидных связей в пектинах: (GalA-GalA > GalA-Rha > Rha-GalA > нейтральный сахар-нейтральный сахар), что позволило выделить гомогалактуронановую область и оценить её минимальную длину [17].

Гомогалактуронан построен более чем из 100 последовательно соединенных α -(1→4)-остатков галактуроновой кислоты [36], в которой карбоксильная группа в различной степени (до 70%) этерифицирована. В дополнение к этому пектин из отдельных видов растений (яблочный) несет ацетильную группу на вторичной гидроксильной группе галактуроновой кислоты [18].

Недавними исследованиями, однако, установлено, что остатки рамнозы присутствуют и в гомогалактуронановой гладкой области блоки GalA примерно в 25 остатков разделены одним остатком Rha, и предположено, что именно эти остатки создают "петли" в молекуле [42]. Другие исследователи доказывают, что один остаток рамнозы приходится в гладкой гомогалактуронановой области на 200 молекул GalA [17].

Ниже представлена общая схема строения пектина:



Особого внимания заслуживает сообщение о строении гомогалактуронановой области пектина цитрусовых не менее 40 GalA единиц приходится на одну молекулу рамнозы. Рамноза, входящая в состав гомогалактуронана, составляет около 15% общего ее содержания в молекуле пектина. Остальные 85% рамнозы входят в состав разветвленной части пектина [20].

В разветвленной ("волосатой") части, структура которой изучалась

особенно интенсивно, рамнозный остаток присутствует в главной цепи, а арабиноза и галактоза в боковых цепях, связанных со скелетом пектина главным образом через С-4-положение рамнозы. Рамногалактуронан из традиционных источников является гетерогенным в отношении молекулярных масс и состава боковых цепей из нейтральных Сахаров. Скелет этого фрагмента молекулы построен из связанного в положении 4 остатка α -D-галактуроновой кислоты и соединенного с ним в положении 2 остатка α -L-рамнозы, с изменяющейся последовательностью. Однако размер олигомеров, из которых состоит эта последовательность, ниже, чем постулированная длина "волосатой" области. Исследование этих отклонений в регулярности разветвления представляет интерес для коммерческих пектинов, так как наряду с величиной СЭ именно строение разветвленной области играет ведущую роль в проявлении функциональных свойств этих макромолекул, особенно в гелеобразовании.

В результате кислотного гидролиза рамногалактуронана получено более двух фракций. Нейтральная боковая цепь быстро гидролизуеться с образованием низкомолекулярных олигомеров, а минорная, с промежуточными значениями молекулярной массы, богата галактуроновой кислотой и рамнозой.

Для сравнения строения всех пектинов и характеристики этой рамногалактуронановой фракции продукты кислотного гидролиза изучали методами диализа, ионообменной хроматографии, спектроскопии ЯМР сахарных фрагментов и других методов их идентификации.

Показано, что фракция рамногалактуронана составлена из серии линейных гомологов олигомеров со строгой последовательностью [4)- α -D-GaLA-(1 \rightarrow 2)- 4Rha (1 \rightarrow], с рамнозой на редуцирующем конце. Напротив, олигомеры, полученные действием рамногалактуроназы [11], имеют галактуроновую кислоту на редуцирующем конце, а рамноза в их составе частично заменена галактозой. Степень полимеризации олигомера составляет 20(10 повторяющихся GalA -Rha единиц). Установлено, что в составе

яблочного пектина 78% рамнозы входит в состав подобных фрагментов. Позднее подтверждена универсальность этого фрагмента для всех пектинов. Однако остался нерешенным до конца вопрос о длине этого фрагмента, оценка его может быть завышена в связи с методическими погрешностями использованием в качестве стандартов глобулярных протеинов и декстранов. Подробно изучено распределение разветвленных фрагментов в различных популяциях пектинов в клеточных стенках растений (плоды яблок), их различная устойчивость к энзиминдуцированному распаду, присутствие и распределение субъединиц во и вне разветвленной части [12].

Из первичных клеточных стенок ряда растений наряду с описанными выше полисахаридами моногалактуронаном и рамногалактуронаном I (РГ-I) выделен рамногалактуронан II (РГ-II) [13, 14]. Рамногалактуронан II составляет до 1-8% массы клеточных стенок растений. Он является главным растворимым полисахаридом клеток растений и, в отличие от гомогалактуронана и рамногалактуронана I, устойчив к действию некоторых энзимов.

Впервые рамногалактуронан II выделен из клеточных стенок смоковницы (*Acer pseudoplatanus*) с помощью грибной эндогалактуроназы [15]. Имеются сообщения о присутствии РГ- II в стенках клеток ели Дугласа *Pseudotsuga menziesii* [2], риса *Oryza sativa* [3], чеснока *Allium cepa* [16], фруктов киви *Actinidia deliciosa* [17], редиса [18], корней *Vupleurum falcatum* [19], листьев *Arabidopsis thaliana* [43] и *Panax ginseng* [21], пульпе сахарной свеклы [44], красном вине [23], яблочном (*Malus domestica*), томатном (*Solanum lycopersicum*), морковном (*Daucus carota*) [24] соках и других источниках.

Изучение РГ- II проводили независимые группы исследователей. Было показано [13], что выделенный из клеточных стенок смоковницы РГ-II содержит 11 различных гликозильных остатков, включая такие редко встречающиеся, как апиоза, 3-С-корбокси-5-дезоксид-Л-ксилоза (ацеровая кислота), 3-дезоксид-D-манно-октулозоновая кислота (КДО), 3-дезоксид-D-ликсогептулосаровая кислота (ДГА), а также метилированные сахара

2-О-метил-L-фукоза, 2-О-метил-D-ксилоза. Большинство гликозидных связей и форма колец в РГ-II, исключая β-D-галактуроновую кислоту, β-L-арабинофуранозу, L-арабинопиранозу и остаток полностью замещенной рамнозы, также необычны. Некоторые из гликозидных остатков РГ-II О-ацетилированы.

Скелет РГ-II представляет собой цепочку по меньшей мере из семи 1,4-связанных

α-D-галактуронозильных остатков, несущую четыре олигосахаридных боковых цепей [25]. Недавно было показано, что РГ-II в клеточных стенках растений существует в виде димера, фрагменты которого кросс-связаны боратым диол-диэфиром, локализованным на одном из остатков апиозы [26,27].

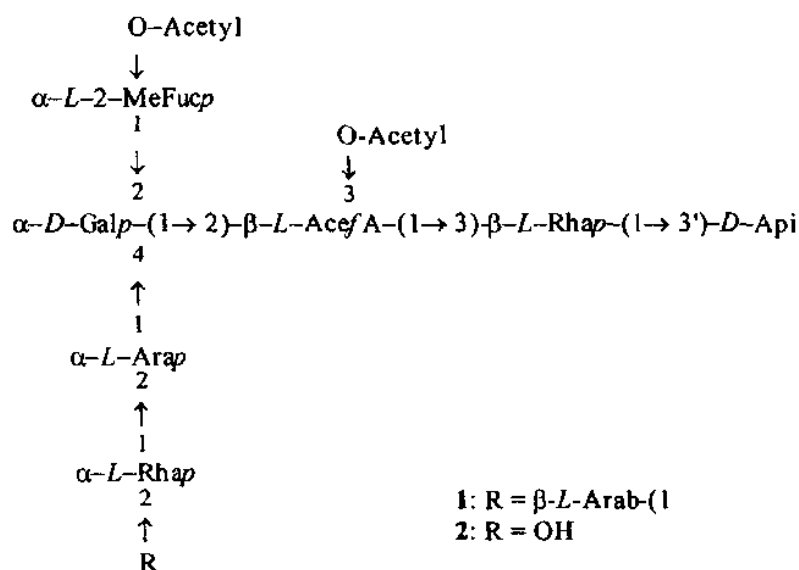
Дальнейшие исследования строения пектинового полисахарида РГ-II проводили с использованием методов селективного кислотного гидролиза в сочетании с деструкцией эндо экзополигалактуроназами, идентификацией монои олигосахаридов с помощью ВЭЖХ, анионообменной хроматографии, масс-спектрометрии.

Химическая фрагментация позволила выделить и установить структуру четырех олигогликозидных боковых цепей, в частности, продукта кислотного гидролиза гептасахаридом 2 [28]. Позднее получена дополнительная уточненная информация о строении фрагментов пектинового полисахарида РГ-II. В результате селективного кислотного гидролиза РГ-II (трифторуксусная кислота) получили по меньшей мере семь других олигосахаридов, структурно связанных с гептасахаридом 2. Установлена полная структура одного из них октасахаридом 1 и частичные структуры шести остальных олигосахаридов. Кроме того, достоверно доказаны места локализации О-ацетильных групп на цепях гептасахаридом 2 и октасахаридом 1. Установлено, что основной скелет РГ-II построен более чем из 11 остатков 1,4-связанной α-D-галактуроновой кислоты [13,].

Дальнейшие исследования пектинов фруктовых соков, подвергнутых

энзиматическому воздействию в процессе получения, подтвердили правильность предложенной модели структуры, связанной с наличием тех же моносахаридных остатков, количественным их соотношением и порядком присоединения. Состав Сахаров исследовали методом хроматографии исключенного объема (ХИС) на сефакриле S-200 [25].

Строение фрагментов РГ-II гептасахарида 2 и октасахарида 1 представлено ниже:

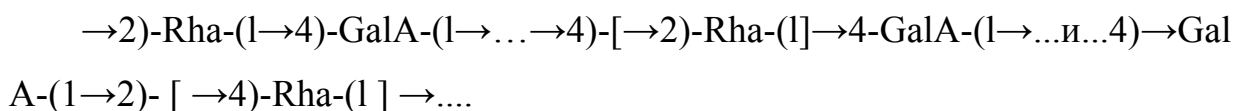


Изучено строение модифицированной разветвленной области из клеточных стенок яблок после омыления, деацетилирования действием ацетилэстеразы и использования возможностей хроматографии исключенного объема (ХИС). Обнаружена, выделена и охарактеризована фракция, богатая ксилозой и галактуроновой кислотой, где ксилоза связана с галактуроновой кислотой β -(1 \rightarrow 3)-связью. Подсчитана степень метилирования в этой фракции, имеющая значения порядка 39, причем показано, что метальные эфирные группы распределены поровну между замещенными и незамещенными галактуроновыми остатками [30].

Среди изученных нетрадиционных источников пектина следует отметить семена физалиса *Nicandra physalodes* [31], корней *Angelica acutiloba* [31], корней *Vupleurum falcatum* [31], листьев женьшеня *Panax ginseng* [34] и

других, многие из которых традиционно широко используются в народной медицине Востока.

Показано, что в составе пектинов *Angelica acutiloba* и *Vupleurum falcatum* [31-] присутствуют такие редко встречающиеся сахара, как 2-метилфукоза, 2-метилксилоза, апиоза, ацеровая кислота. Пектин из этих источников характеризуется повышенным содержанием фрагмента α -D-(1 \rightarrow 4)-галактуронана, в сочетании с малым содержанием фрагментов, подобных РГ-II. Охарактеризовано строение участка молекулы пектинов РГ-I, устойчивого к действию эндогалактуроназы, и предложена схема его строения:



Среди особенностей строения выделенных пектиновых полисахаридов женьшеня, строение которых изучено подробно, следует отметить наличие более длинной, чем у иных ранее исследованных полисахаридов, цепочки нейтральных Сахаров, иного типа замещения отдельных сахарных фрагментов [34].

В пектиноподобных арабиногалактанах красного вина в составе уронидной составляющей установлено повышенное содержание ппокуроновой кислоты (3-7%). Сложность изучения структуры пектиновых молекул подтверждают результаты исследования пектина клеточных стенок томатов методом атомной микроскопии. В молекуле пектина обнаружена необычная, ранее не известная структура разветвления, отличающаяся от установленной ранее по результатам энзиматического отщепления нейтральных боковых цепей и анализа сахарных единиц. Ответвления имели длину от 30 до 170 нм и были относительно линейными. В работе сделана попытка интерпретации природы и порядка образования этих длинных ветвей боковых цепей молекулы.

1.3.Изучение молекулярно-массовых и конформационных характеристик пектиновых веществ

Изучение пектинов как природных высокополимеров один из значительных разделов в структурных исследованиях, где широкое применение нашли традиционные методы химии высокомолекулярных соединений.

Известно, что молекулярная масса, дисперсность, а также стабильность растворов пектина в значительной мере зависят от природы и вида применяемого для его извлечения экстрагента и степени термического воздействия при его получении [37,]. Вязкость разбавленных растворов пектинов одна из важнейших характеристик, позволяющая оценить молекулярно-массовые, физико-химические и конформационные особенности пектиновых полисахаридов. Вязкость и плотность разбавленных растворов пектина исследованы в ряде работ [39].

Вискозиметрическим методом определены характеристические вязкости $[\eta]$ хлопкового, свекловичного, яблочного и лимонного пектинов, составляющие 0.6-1.29 [42]. С помощью этих показателей определены молекулярные массы некоторых пектинов: свекловичного 14000, хлопкового 15500, яблочного 37000, виноградного 21000, лимонного 25800.

Исследовано влияние температуры на вязкость водных растворов пектовой кислоты и ряда ее производных. Получены параметры активации для вязкого течения с учетом взаимодействия полимер-растворитель [43].

Надмолекулярная структура растворов различных образцов пектина установлена путем исследования спектра мутности, позволяющего судить о различиях в конформационной структуре биополимеров, характере растворимости и наличии гель-фракции. Особенно значительно содержание последней в пектиновых экстрактах из хлопковых створок [42]. Методом ультрацентрифугирования установлена молекулярная однородность и качественно оценена степень полидисперсности пектинов из различных растительных источников. Образцы хлопковых и яблочных пектинов имеют

ярко выраженную монодисперсность и характеризуются отсутствием низкомолекулярных фракций.

По результатам седиментационных исследований проведен полный анализ молекулярно-массовых и конформационных характеристик лимонного пектина со степенью этерификации 64.5% и 1.849 дл/г [10]. Рассчитаны молекулярные массы различных степеней усреднения и степень полидисперсности: $M_z = 2.25 \times 10^5$, $M_w = 1.47 \times 10^5$ и $M_z / M_w = 1.53$. Проведена количественная оценка гибкости макромолекул лимонного пектина, установлены длина сегмента Куна ($A = 120 \pm 4 \text{ \AA}$) и гидродинамический параметр цепи ($d = 11.0 \pm 2 \text{ \AA}$) [44]. Изучена оптическая плотность ряда образцов цитрусовых пектинов. Установлена прямолинейная зависимость значений этого показателя от концентрации -COOH в биополимере.

Методом светорассеяния исследованы тенденции к ассоциации в разбавленных растворах образцов высокометоксилированного коммерческого лимонного пектина в фосфатном буфере. Модельные расчеты подтвердили, что адекватным описанием образцов пектина является бимодальная система, состоящая из молекулярно-диспергированного главного компонента и небольших количеств частиц более высокомолекулярных компонентов [46].

Продолжаются исследования производных пектинов, в частности их металлопроизводных, для решения ряда структурных задач. Хотя первичная структура пектина широко изучена, вторичная, третичная и четвертичная структуры в гелях или растворах окончательно не установлены.

Кросс-связывание молекул пектинов ионами кальция играет большую роль в организации полисахаридов в стенках клеток растений. Структура агрегированных цепей описывается моделью "egg-box" [4]. В этой модели соединяемые сегменты находятся на одинаковых цепях и зоны спаривания образованы цепями галактуронана в 2_1 -спиральной конформации (два моносахаридных остатка на поворот спирали), а ионы Ca^{+2} размещаются в пространстве между соседними спиральными цепями полисахаридов, подобно яйцу в решетке, образуя комплексы с атомами кислорода.

Вследствие этого конформация кросс-связанных участков цепи в гелях отличается от таковой свободных цепей пектинов в растворе [5].

С помощью метода ЯМР¹³C показано, что структура гидратированного геля представляет собой 2₁-спираль, в отличие от 3₁-спирали сухого Са-полигалактуронана, причем в концентрированных образцах Са²⁺ пектата могут наблюдаться переходы от димера 2₁-спирали к олигомеру 3₁-спирали, через промежуточные спиральные агрегированные формы. Другие дивалентные катионы также образуют гели. Однако конформация цепей в этих гелях до конца не изучена.

Известно, что эфирные металльные группы сильно влияют на связывание ионов и проявление гелеобразующих свойств. Эфирные группы несут отрицательный заряд и стерически затрудняют образование агрегированных цепей. Степень выраженности этого эффекта, а также геометрия связанных фрагментов в основном зависят от природы (размера) катиона, а также вида пектина [13].

Конформация цепи в зоне кросс-связывания изучена с помощью различных методов кругового дихроизма, малоуглового рассеяния, масс-спектрометрии, ИК-Фурье-спектроскопии [2]. Результаты исследования последним методом подтвердили, что координация металла с цепью пектина дивалентными катионами на примере пектатов и пектинатов калия соответствует модели "egg—box". По данным ИК-Фурье, слабое взаимодействие Mg⁺² с пектатом калия наблюдается даже в том случае, когда гель не образуется. Са²⁺ и Sr²⁺ образуют прочные комплексы с пектатом и низкометилированным пектинатом, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ и Pb²⁺ с пектинатом при СЭ 59.1 %, а Рb²⁺ и Си²⁺ даже с высокоэтерифицированными пектинами [15].

Результаты исследования водных растворов пектата натрия методом ЯМР подтвердили совпадение предложенной модели вторичной структуры пектина с данными, полученными по гидродинамической теории и молекулярному моделированию. Оптимальная модель может быть описана как анизотропная

реориентация двускладчатого спирального сегмента, содержащего 29 моносахаридных остатков. При этом средняя аксиальная длина спирального сегмента равна 13 нм, что превосходно согласуется со значениями, полученными по методу малоуглового рассеяния и молекулярной механики. Поперечный гидродинамический радиус спирального сегмента равен 0.8 нм, тогда как ковалентный радиус 0.4—0.45 нм. Увеличение гидродинамического радиуса по отношению к ковалентному свидетельствует о противоионной конденсации в поддержку полиэлектролитной теории [47].

1.4. Исследование степени этерификации

Как упоминалось выше, анализ и оценка степени этерификации один из важнейших элементов структурных исследований пектинов вследствие тесной корреляции величины этого показателя, наряду с конформационными особенностями молекулы, с гелеобразующими свойствами пектинов и, следовательно, их пригодностью для нужд пищевой промышленности.

В настоящее время для определения СЭ пектинов наиболее широко применяется классический метод титрования [49]. Альтернативой ему является отщепление метанола путем деэтерификации с помощью энзимов, обработки щелочами или кислотами с последующим определением выделенного метанола хроматографически [51].

Недавно описан способ использования хроматографии исключенного объема (ХИО) с системой двойного определения последовательным мониторингом рефракции и проводимости для целей определения СЭ пектинов [15]. Количество корбоксилатов, определяемое как mmol корбоксильных групп пектина на грамм пектина, рассчитывается по сравнению со стандартом известным соединением. Способ, однако, ограничен необходимостью предварительной оценки содержания ангидрогалактуроновой кислоты в образце.

Предложен способ определения внутримолекулярного распределения СЭ, включающий анализ пектина ионообменной хроматографией с

использованием буфера, с увеличивающимся градиентом по ионной силе и концентрации. Однако элюируемые фракции пектина полидисперсны по отношению к СЭ и, следовательно, распределение СЭ, зависящее от средних значений, является приблизительным [2].

Изучена возможность использования для определения СЭ капиллярного электрофореза [35], тем более, что пектин, в отличие от других полисахаридов, имеет в цепи заряды и УФ-хромофорные группы, что дает возможность прямого исследования его растворов. Методика определения СЭ разработана для водных растворов пектина в концентрации 0.5-5 мг/мл, с использованием фосфатного буфера (рН 7.0) и УФ-детектора (192 нм). В этом экспрессном методе количественного анализа используется линейная зависимость между электрофоретической подвижностью и средним зарядом на остаток моносахарида, рассчитанным как $z = -(100 - \text{СЭ})/100$. Для фиксированного заряда не найдена зависимость электрофоретической подвижности от внутримолекулярного распределения зарядов.

Способ определения СЭ пектина с помощью капиллярного электрофореза опробован на ряде его образцов, отличающихся строением и содержанием нейтральных Сахаров [42]. В качестве стандарта использован лимонный пектин со СЭ 31.1-75.8%. Показана возможность оценки внутримолекулярного распределения СЭ непосредственно по характеру пиков. Независимо от типа исследуемых пектинов (цитрусовый, яблочный, свекловичный), отличающихся СЭ и содержанием нейтральных Сахаров, получено хорошее совпадение с результатами титрования, а также результатами ИОХ и ХИО. Преимущество метода перед хроматографическими простота и экспрессность. Отмечено, что определение СЭ способом капиллярного электрофореза занимает не более 2 ч, включая подготовку образцов и калибрование, тогда как методы ХИО и ИОХ требуют не менее двух дней.

1.5. Способы получения пектинов

Значительный практический интерес представляют работы по способам получения и очистки пектинов. Несмотря на разработку современных мембранных технологий и выраженное стремление крупнейших производителей пектина к получению высокоочищенных его концентратов с помощью мембранной техники [6], ряд вариантов традиционных методов выделения и очистки пектинов все еще продолжает оставаться предметом исследования, совершенствования и патентования. Очевидно, это объясняется ограниченной доступностью упомянутой мембранной техники и, возможно, отсутствием потребности практического применения пектина столь высокой степени очистки.

Фирма "Мицубиси рэйен К.К." (Япония) продолжает исследование экстракции пектина из яблочных выжимок раствором ортофосфорной кислоты с последующим нагреванием смеси и отделением пектинового экстракта. После удаления из экстракта твердых веществ произведена очистка пектина с использованием катионообменных и анионообменных смол [45].

В зависимости от желаемого комплекса свойств получаемого пектина растительное сырье подвергают предварительной обработке ≥ 0.1 н. раствором кислоты в количестве, меньшем массы растительного сырья. В процессе такой обработки происходит частичное деметоксилирование пектина, последующее извлечение которого проводят также раствором кислоты указанной концентрации [7].

В зависимости от состава пектинового экстракта из различных источников использованы следующие варианты способов очистки:

очистка пектина из водного экстракта путем осаждения из него пектина действием кислоты в концентрации 0.05-1.0 н. или смешивающегося с водой органического растворителя в смеси с кислотой [32];

использование твердых материалов типа перлита, целлюлозы и других сорбирующих ингредиентов для облегчения осветления и фильтрования пектинового экстракта с адсорбцией мелких частиц экстракта. Эти вещества

добавляют к пектиновому экстракту в количестве 100 г на 30-200г последнего, прессуют, отделяют нерастворимый продукт, жидкую часть осветляют обычным способом, после чего фильтруют повторно [17];

Обработка пектинсодержащего сырья соединениями щелочноземельного металла в условиях, способствующих протеканию химического взаимодействия. После разделения продукции на фракции, в различной степени обогащенные пектином, щелочноземельный катион в пектатах замещают на водород путем ионообмена. После удаления из фракции воды получают сухой продукт с высокой стабильностью при хранении [44];

Использование способности образовывать пектаты при взаимодействии с другими ионами металлов (Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} (3^{+})) для усовершенствования способа очистки пектина. Осадки пектатов Al , Si , или Fe , полученные обработкой пектинового экстракта растворами солей этих металлов, промывают смесью слабого раствора серной кислоты и органическими растворителями без растворения осадков. Очищенный осадок пектина отделяют. Из кислого промывного раствора осаждением гидроксидами кальция или бария получают дополнительные количества пектатов кальция и бария, из которых пектин выделяют действием кислот и органических растворителей .

Изучена экстракция пектиновых веществ из отшелушенных, обезжиренных и обработанных 80% этанолом семян рапса с целью изучения влияния на этот процесс природы экстрагирующих агентов, в качестве которых использованы циклогексан транс-1,2-диамин- N,N,N',N' -тетраацетат (ЦДТА), ацетатный или фосфатный буферы; рН экстрагирующего раствора и его ионной силы.

Экстракт подвергают последующей обработке раствором карбоната натрия. При этом наибольший выход пектина получен при рН 6.5 с ЦДТА, а пектин, извлеченный в этак условиях, имеет большее содержание уроновых кислот и наименее разветвленную вариацию основной цепи [45].

Альтернативным источником пектиновых веществ может служить жом плодов шиповника, остающийся после получения каротолина и масла

шиповника. Показано, что плоды шиповника иглистого (*Rosa acicularis* Lindl), произрастающего на территории республики Хакасии, содержат 5,5 – 6,0 % пектиновых веществ.

Пектин, выделенный из жома плодов шиповника, не имея постороннего вкуса и запаха, обладал хорошей желирующей способностью, средней степенью метоксилирования, хорошими органолептическими показателями, необходимыми для пищевого пектина.

Кроме того, возможно получение пектиновых веществ из вегетативной части *Rosa acicularis*. Уничтожаемые в результате рубок ухода, побеги шиповника иглистого содержат около 4 % пектина на сухое вещество. Пектин из вегетативной части шиповника обладает хорошей растворимостью, хорошими желирующими свойствами, удовлетворяет требованиям, предъявляемым на предприятиях пищевых производств.

Изучен процесс экстракции пектина из кожуры апельсинов кислотным гидролизом, исследовано влияние температуры, времени, pH и необходимого объема жидкости для экстракции. Установлено, что только температура оказывает влияние на статистически значимые показатели процесса [46].

В Институте химии и физики полимеров АН РУз созданы технологии получения пектинов из отходов цитрусовых, предусматривающие гидролиз-экстракцию сырья разбавленной соляной кислотой, отделение экстракта: фильтрование, нейтрализацию, осаждение пектина действием этилового спирта. С целью получения высокоэтерифицированного пектина, повышения выхода и качества целевого продукта гидролиз-экстракцию проводят 0.05-0.1% раствором соляной кислоты при нагревании до 81-87°C, причем кислоту вводят вначале в количестве 0.42-0.5 от общего количества с выдержкой реакционной массы до 50-80 мин, затем последовательно вводят по 0.2-0.3 части от общего количества соляной кислоты с выдержкой по 35-40 мин. С целью получения пектина, обладающего бактерицидной активностью, отходы цитрусовых предварительно обрабатывают паром, а гидролиз-экстракцию проводят при pH 1.0-1.5, температуре 92-96°C в течение

2.5-3.0 ч при гидромодуле 1:10-1:12. Решая задачу получения пектина более высокого качества со сниженной аллергенностью, предварительно проводят отгонку эфирных масел из отходов цитрусовых, используемых в качестве сырья, при температуре 110- 120°C, а гидролиз-экстракцию проводят в течение 1.5-2.0 ч .

Изучены химические и физические свойства пектина, полученного из *Satsuva mandarine*, кислотной экстракцией под давлением с использованием в качестве экстрагента раствора оксалата аммония. Это позволило получить пектин с наименьшей молекулярной массой, низким содержанием галактуроновой кислоты и метоксильных групп .

Этот же экстрагент использован для извлечения пектиновых полисахаридов из растения *Lemna minor*. Извлечено четыре полисахарида ПС-1, ПС-2, ПС-3 и ПС-4 с молекулярными массами соответственно 50200-75400, 18800-99700, 24200-50000 и 6170-16300. Установлено, что ПС-2 содержит галактуроновую кислоту, апиозу, ксилозу, арабинозу и рамнозу, тогда как ПС-4 галактуроновую кислоту, апиозу и ксилозу. В составе ПС-2 определены незначительные количества фруктозы, маннозы и глюкозы, а ПС-4 рамнозы, фруктозы, арабинозы, маннозы и глюкозы. Ранее в растительных источниках не найдены пектины, подобные ПС-4, со столь высоким содержанием галактуроновой кислоты (не менее 96%) и низкой степенью этерификации [47].

Исследован процесс экстракции пектинов из измельченной кожуры яблок, лимонов и апельсинов после предварительной обработки в поле сверхвысокой частоты (2450 МГц, мощность 0.5 кВт). Такая обработка обеспечила высокий выход массы пектина. Выделенный пектин имеет более высокую степень этерификации и прочность геля по сравнению с контрольными образцами. Эффект волнового нагрева зависит и от вида исходного сырья. Выход и качество пектина зависят от степени дезинтеграции растительной ткани и гидролиза протопектина, а также скорости инактивации пектолитических ферментов в сырье. Эти выводы подтверждены при

проведении процессов экстракции на модельных соединениях. Результаты исследования могут послужить основой для улучшения качества пектина, производимого по применяемым технологиям. Заготавливаемое впрок сырье может быть подвергнуто волновой обработке перед высушиванием.

Пектин хорошего качества и с высоким выходом выделен вместе с пигментами из кожуры белого винограда с использованием традиционной последовательности операций экстракции сырья в условиях нагрева, центрирования, фильтрации и осаждения спиртом. Обесцвечивание пектина с освобождением от красителя производится обработкой ацетоном [49].

Исследован процесс гелеобразования высокометоксилированного пектина, индуцированного высоким давлением. Изучена структура образцов геля и стабильность межмолекулярных сил DSC термическим методом. Показано, что на гелеобразование высокометоксилированного пектина давление и температура оказывают синергетическое воздействие. Наиболее устойчивый и прочный гель образуется при давлении 3.6-3.9 атм, концентрации пектина 1.5% и температуре 43-45° С .

1.6. Биологическая активность пектинов

Широко распространенные в природе пектиновые вещества играют важную физиологическую роль в жизнедеятельности растений, выполняя функции структурообразования, ионного и водного обмена. Являясь необходимыми элементами питания, эти соединения проявляют также разнообразную биологическую активность, благотворно влияя на метаболизм у человека и животных.

Последние годы характеризуются большим объемом экспериментальных и клинических исследований в области фармакологии и медико-биологического действия пектинов. Широко изучена их способность выводить из организма токсические соединения, в частности, связывать катионы поливалентных металлов, в силу чего высокоэтерифицированные, например цитрусовые, пектины могут быть использованы в качестве

профилактического средства для работающих в условиях высокого загрязнения и экологического неблагополучия. Проявляя свойства пищевых волокон, пектины улучшают моторику желудочно-кишечного тракта, изменяя характер всасывания питательных веществ и примесей, способствуя нормализации обмена веществ, понижению уровня холестерина в крови, улучшению его метаболизма в печени, снижению процессов перекисного окисления липидов]. В экспериментах на животных показана эффективность снижения лимонным пектином глюкозы в крови и плазме. Не вызывает сомнения эффективность пектинов в лечении диареи у детей [50].

Наиболее ценным свойством пектинов представляется антиканцерогенное и/или антиметастатическое действие, выявленное на примере яблочного пектина в экспериментальных моделях карциногенеза кишечника и метастазов печени. В Японии запатентовано использование метоксилированного яблочного пектина для лечения рака кишечника.

В экспериментах на животных обнаружена способность торможения метастазов первичной опухоли продуктами фрагментации молекулы цитрусового пектина в виде 0.1% раствора. Фрагментация (наряду с деметоксилированием) осуществляется путем попеременного воздействия растворами едкого натра и соляной кислоты с последующим доведением рН до 6.3. Средняя молекулярная масса полученных фрагментов составляет 10 кД. В отличие от контроля при использовании данного препарата не отмечено роста метастазов.

Исследовано действие цитрусового пектина и рН-модифицированного цитрусового пектина на свойства связанных с галестином-3 клеток меланомы. Модифицированный цитрусовый пектин ингибирует адгезию В16-F1 клеток меланомы к ламинину и их гомотипную ассоциацию [52].

Обращает на себя внимание использование пектина в качестве матрицы носителя для биологически активных компонентов или лекарственных препаратов. К таковым относятся продукты взаимодействия цитрусового пектина с антигельминтными препаратами. Изучена иммобилизация

изониазида на пектиновых веществах, показано, что продукт обладает более высокой туберкулостатической активностью по сравнению с чистым изониазидом. Перспективно также использование химически модифицированных пектинов в качестве носителей лекарственных препаратов для лечения кишечника [23]. Эффективен для этих целей кросс-связанный пектин, менее растворимый и менее подверженный деградации в организме, который рекомендован для направленного введения лекарственных веществ в желудочно-кишечный тракт, а также кальций-пектинатный гель [26].

Таким образом, предварительный анализ доступной информации последних лет в области химии, технологии, свойств и применения пектинов позволяет сделать вывод, что исследования в этой области по-прежнему не утратили своей актуальности. Широкие возможности новых высокоинформативных хроматографических методов (ХИО, ВЭЖХ, АОХ), ЯМР, ЯМР ^{13}C , масс-спектропии, атомной микроскопии, капиллярного электрофореза и других позволили выявить новые, недоступные ранее детали структуры и пространственного строения пектинов и их производных. Исходя из этого можно полагать, что интересы исследователей пектинов по-прежнему сосредоточены на углублении знаний о их строении и физико-химических свойствах.

В новых вариантах способов получения пектинов в зависимости от вида исходного сырья решаются задачи повышения производительности процессов, оптимизации выхода, повышения степени очистки. Задачи получения пектинов с заданным комплексом свойств в зависимости от полидисперсности, молекулярной массы, степени этерификации и очистки решаются даже путем усложнения технологии и использования нетрадиционных средств экстракции, приемов очистки и осаждения, введения механохимической обработки сырья.

Расширился круг исследований физиологической активности пектинов и их производных, новых аспектов их полезного биологического воздействия.

По-видимому, одним из перспективных направлений исследований, наряду с поиском пектиновых веществ в нетрадиционных источниках с новыми элементами строения (состав, конформационные особенности), следует считать химическую модификацию достаточно подробно изученных и доступных пектинов из традиционных источников, проводимую как путем изменения активных функциональных групп, введения комплексно-связанных ионов металлов, кросс-связывания и др., так и путем создания пектиновых полимер-полимерных систем с участием иных полисахаридов, протеинов и т.п. Преимущество подобных подходов заключается в возможности усиления и широкого варьирования медико-биологических, гелеобразующих и других свойств пектиновых веществ.

1.7. Производство пектина

Для производства пектиновых веществ можно использовать любое растительное сырье с высоким содержанием пектина. Ныне перерабатывают четыре основных вида сырья: яблочные выжимки, жом сахарной свеклы, корзинки подсолнечника и корочки цитрусовых. Содержание пектина в данных материалах соответственно 10-15, 10-20, 15-25 и 20-35%.

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 лаймы (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. Пектины, выделенные из одного вида сырья, получили название классических. Для производства продукции с особыми свойствами, разработаны процессы, основанные на переработке комбинированных видов сырья. Так, из смеси яблочных выжимок и корочек цитрусовых можно получить пектин, сочетающий достоинства яблочного и цитрусового.

Современные промышленные технологии позволяют производить классические и комбинированные пектины с заданными свойствами. Для экстракции пектина в установках непрерывного действия используют минеральные кислоты. Максимальный выход пектина с одновременным сохранением его желирующих свойств достигается при оптимальной сбалансированности основных экстракционных параметров: рН гидролизующего агента, температуры и длительности экстракции.

Яблочный пектин обладает высокой степенью этерификации - 75-78%. Для производства низкоэтерифицированных пектинов концентрированный жидкий экстракт на следующем этапе подвергают деэтерификации или омылению. При этом происходит контролируемое снижение степени этерификации до требуемой величины, а также гидролиз боковых цепочек пектина, состоящих из нейтральных полисахаридов. Пектин нерастворим в спирте. Это свойство используют для его осаждения из жидкого концентрата. Процесс протекает в установках непрерывного действия. Концентрация используемого спирта влияет на режим осаждения и тем самым на выход и чистоту пектина. После отделения пектинового осадка спирт направляют на дистилляцию. Полученный чистый спирт повторно используют в производстве.

Лабораторный контроль и стандартизация.

В зависимости от области применения пектины стандартизуют по гелеобразующим свойствам. Желаемого результата можно достигнуть

добавляя к пектину сахар, нейтральные соединения и/или буферные вещества, а также смешивая чистые сорта пектина. Для стандартизации используют метод США-CAT (USA-SAG). Для точного измерения способности пектинов образовывать гели, а также для определения внутренней прочности геля к разрыву используют метод Люерса и прибор "Хербстракт-Пектинометр. Модель Марк-3". В лаборатории контролируют качество полученного продукта (степень этерификации, молекулярная масса, содержание D-галактуроновой кислоты и т.д.), а также соответствие пектина критериям чистоты законодательства о пищевых добавках, европейским нормам, положениям Объединенного комитета Всемирной организации здравоохранения и Продовольственной и сельскохозяйственной организации (WHO/FAO).

При отгонке спирта, использованного для осаждения пектина, получают сахаристые вещества, органические кислоты, красители и аро-матизаторы. Они имеют вид фруктовых экстрактов, которые можно применять в пищевой промышленности в качестве стабилизирующих, красящих и подслащивающих веществ. Яблочные экстракты можно использовать для получения питьевого и технического спирта. Дспектинизированные выжимки сушат и гранулируют. Благодаря высокому содержанию питательных веществ они идут на корм скоту [16]

1.8. Применение пектиновых веществ

Кондитерские изделия. На сегодняшний день огромное разнообразие кондитерских изделий предоставляет неограниченные возможности для применения пектина. Высокоэтерифицированный пектин успешно применяют для производства мармелада, жележных начинок, сбивных кондитерских изделий, таких как зефир, пастила, сбивные конфетные массы. Для производства мармеладной продукции и жележных конфет можно использовать высокоэтерифицированные яблочные WEJ-5 или яблочно-цитрусовые или цитрусовые пектины (очень медленной садки),

яблочные или яблочно-цитрусовые пектины (медленной садки) [17].

Для производства зефира возможно применение различных типов высокоэтерифицированных пектинов, обеспечивающих разную скорость студнеобразования, что немаловажно при выборе типа пектина в зависимости от имеющегося в наличии оборудования и технологических особенностей производства. Для производства зефира и сбивных изделий можно использовать высокоэтерифицированные яблочные WEJ-1 или яблочно-цитрусовые WECJ-1 пектины (средней садки), яблочные WEJ-2 или яблочно-цитрусовые WECJ-2 пектины (медленной садки). Рекомендуемая дозировка пектина в сбивные и желейные кондитерские изделия находятся в пределах 1,0-1,8 %.

Возможно применение низкоэтерифицированных пектинов, желирующих без кислоты, в производстве мармелада и желейных начинок с нейтральными вкусами (например, с ароматизаторами мяты, корицы, рома).

Джемы и конфитюры. Роль пектина заключается в развитии структуры джема, которая сохраняется без изменений при транспортировке готовой продукции, в усилении аромата и в подавлении синерезиса, а также в компенсации недостатка природного пектина в диабетических джемах. В процессе производства джема пектин должен обеспечить равномерное распределение частиц фруктов в массе с того самого момента, когда механическое перемешивание закончено, т.е. пектин желирует массу сразу после ее розлива. Для джемов с высоким содержанием сухих веществ можно использовать высокоэтерифицированные яблочные или яблочно-цитрусовые пектины (очень медленной садки), яблочные или яблочно-цитрусовые пектины (медленной садки). Рекомендуемая дозировка пектина в джемах и желейных изделиях находятся в пределах 0,1 - 0,5 %.

Традиционная область использования низкоэтерифицированного пектина - это джемы с содержанием сухих веществ ниже 55%, которые ограничивают использование высокоэтерифицированного пектина.

Тип низкоэтерифицированного пектина выбирается с учетом

содержания сухих веществ, кислотности среды, в которой будет использован продукт. Для джемов с содержанием сухих веществ 40-55 % можно использовать амидированные низкоэтерифицированные пектины яблочный 1 или яблочно-цитрусовый , а для джемов с содержанием сухих веществ 30-50 % амидированные низкоэтерифицированные пектины яблочный или яблочно-цитрусовый. Рекомендуемая дозировка пектина в джемы и конфитюры 0,4-0,9 % в зависимости от желаемых вкусовых характеристик.

Термостабильные фруктовые начинки. Термостабильная фруктовая начинка должна обладать важным качественными свойствами: высокая температура плавления, устойчивость к механическим воздействиям, хорошая способность к перекачиванию и дозированию, способность сохранять аппетитный внешний вид после выпечки. Для производства термостабильных наполнителей с высоким содержанием сухих веществ можно использовать высокоэтерифицированные пектины яблочный или яблочно-цитрусовый или цитрусовый .

Фруктовые наполнители для йогурта. Низкоэтерифицированные пектины применяют в производстве фруктовых наполнителей для йогурта, в которых пектины образуют мягкую желированную структуру, достаточно плотную для равномерного распределения фруктовых частиц. Пектин, особенно в сочетании с другими растительными камедями, препятствует переносу цвета фруктового наполнителя на молочную фазу готового продукта. Для производства наполнителя для йогурта с содержанием сухих веществ 25-35 % можно использовать амидированные низкоэтерифицированные пектины яблочный или яблочно-цитрусовый.

Фруктовые соки и напитки. Для производства напитков применяют различное фруктовое сырье и соковые концентраты. Природный пектин и сахар обеспечивают вкусовое восприятие сока. Недостаточное их содержание сразу сказывается на вкусовых качествах фруктового сока и напитков. Пектин придает напиткам полноту вкуса и насыщенность. Желирующие свойства

пектина позволяют получить однородный продукт без оседания мякоти.

Пектины нейтральны во вкусовом отношении, они поддерживают в напитке натуральный аромат используемого фруктового сырья. Для производства фруктовых соков и напитков можно применять высокоэтерифицированные пектины яблочный WEJ-3 или яблочно-цитрусовый WECJ-3. Низкие дозировки дополнительно вводимого пектина идеальным образом компенсируют потерю полноты вкуса. Рекомендуемая дозировка пектина в напитки 0,02-0,25 % в зависимости от желаемых вкусовых характеристик.

Применение пектинов в производстве хлебопекарных изделий.

Установлено, что внесение в тесто пектинов влияет на биологические, коллоидные и микробиологические процессы приготовления теста. При внесении в тесто пектинов повышается его начальная кислотность, снижается рН. Процесс брожения в тесте идет более активно. Активацию процесса брожения связывают с внесением сахаров вместе с пектином. Кроме того, установлено, что содержание пектина в готовом хлебе уменьшается в сравнении с исходным количеством, внесенным в тесто. Это свидетельствует о том, что при брожении теста происходит дезагрегация биополимера и что она осуществляется с образованием моносахаридов, способствующих активации процесса брожения. Московским государственным университетом пищевых производств проведены интересные исследования влияния яблочного пектина на качество пшеничного хлеба и пряников. Для опытов тесто готовили безопарным способом. Яблочный пектин вносили взамен муки в количестве 0,05-2,0% массы муки. Результаты свидетельствуют о том, что качество хлеба с добавлением пектина по органолептическим, физико-химическим показателям, а также по удельному объему хлеба и показателям структурно-механических свойств мякиша выше по сравнению с продуктом без добавления пектина [8].

Наибольший удельный объем наблюдали при добавлении 0,1% пектина - он увеличился на 6,1% по сравнению с удельным объемом хлеба без пектина.

При дозировке пектина свыше 0,3% массы муки удельный объем хлеба уменьшался по сравнению с хлебом, имеющим меньшее количество пектина, однако он оставался выше, чем у хлеба без пектина, на 3,1 - 4,6% [3].

Уменьшение удельного объема и снижение остальных показателей качества хлеба по мере увеличения дозировки пектина с 0,3 до 2,0% обусловлено способностью последнего связывать воду, что оказывает влияние на влажность теста и качества хлеба.

Экспериментальные данные и их математическая обработка позволили установить оптимальную дозировку яблочного пектина при производстве хлеба из пшеничной муки.

Установлено также влияние степени этерификации пектина на качество хлеба из пшеничной муки. Наиболее высокие показатели при одинаковых дозировках пектина имел хлеб с добавлением низкоэтерифицированного пектина [7].

Удельный объем хлеба с добавлением низкоэтерифицированного яблочного пектина в количестве 0,05 - 0,1% возрос на 19,6 - 25,5%, а с добавлением тех же дозровок высокоэтерифицированного пектина - на 13,7 - 19,2% по сравнению с хлебом без пектина [16].

Способ внесения сырья существенно влияет на качество хлеба. Для определения оптимальной технологии тесто готовили на густой и жидкой опаре. Низкоэтерифицированный пектин вносили в оптимальной дозировке как в опару, так и в тесто. В обоих случаях качество хлеба улучшалось. Однако показатели качества хлеба при внесении пектина в опару были выше, чем при внесении его в тесто.

Благодаря своим особым физико-химическим свойствам пектин влияет на срок сохранения свежести хлеба. О черствении хлеба судили по изменению структурно-механических свойств мякиша из пшеничной муки через 4, 18, 24 ч хранения. Изменение в процессе хранения показателей структурно-механических свойств мякиша хлеба с добавлением пектина в количестве 0,05 - 1,0% массы муки свидетельствует о том, что хлеб с

добавлением пектина черствеет в 1,04 - 1,9 раза медленнее хлеба без пектина, что чрезвычайно важно для увеличения срока реализации хлебопекарных изделий [5].

Исследовали влияние яблочных пектинов со степенью этерификации 59-64, 76-78 и 38-44 % на качества заварных пряников. Тесто готовили по рецептуре массовых сортов заварных пряников типа «Северные». Пектин в количестве 0,05; 0,07; 0,1 и 0,2% вносили в заварку и в тесто взамен муки [12].

Добавление высокоэтерифицированного и низкоэтерифицированного яблочных пектинов как в заварку, так и в тесто улучшает качество пряников, о чем свидетельствует увеличение набухаемости и отношения H/D , а также снижение плотности пряников. Наилучшее качество имели пряники с добавлением низкоэтерифицированного яблочного пектина в количестве 0,1% массы муки. Установлено, что внесение пектина в заварку улучшает качество пряников в большей степени, чем внесение его в тесто. Так, например, величина набухаемости пряников с добавлением 0,1% пектина в заварку увеличивалось на 40%, а в тесто – на 25% по сравнению с набухаемостью пряников без пектина. Объясняется это строением и свойствами низкоэтерифицированного пектина. При этом внесение пектина в заварку обеспечивает лучшие условия для взаимодействия муки с пектином.

Скорость черствения пряников определяли как по изменению набухаемости пряников, так и по изменению свободной связанной влаги через 1, 2, 3, 5, 10, 15 и 30 сут. хранения. Установлено, что добавление в оптимальной дозировке низкоэтерифицированного яблочного пектина в заварку снижает скорость черствения в 2,9 раза, а в тесто – в 1,7 раза [18].

Применение пектинов в фармацевтике

Пектины извлекают из естественного растительного сырья практически в неизменном виде, при этом сохраняются все физиологически ценные

свойства. Пектины как растворимые пищевые волокна благотворно влияют на состояние здоровья человека. Для производства фармацевтических продуктов можно использовать высокоэтерифицированные пектины яблочный или яблочно-цитрусовый.

- в профилактических целях при работе с отравляющими веществами;
- при лечении лучевой болезни;

В профилактических целях при работе в горнодобывающей отрасли;

- при заболевании органов пищеварения;
- при лечении диарейных инфекций;
- при полиартритах;
- при лечении сахарного диабета;
- при лечении гемофилии, при заживлении ран и ожогов;
- при лечении язв желудка, простатита и профилактике рака толстой кишки;
- в качестве составной структурирующей части лекарственных препаратов фармацевтике.

Для технических целей:

- производство D-галактуроновой кислоты;
- в геологии используется в качестве пектинового клея при бурении;
- в текстильной промышленности при отделке тканей;
- в литейном производстве в качестве добавки в формовочные смеси, благодаря чему достигается более высокая точность отливок;
- в металлообрабатывающей промышленности при закалке деталей;
- в полиграфии при закреплении печатных материалов

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Инфракрасная спектроскопия.

Спектроскопия - это наука о взаимодействии электромагнитного излучения с веществом, которое даёт информацию о самом веществе, атомах и молекулах, составляющих вещество, о его строении и свойствах. Спектроскопия использует весь диапазон электромагнитного излучения, включая гамма - лучи, рентгеновские лучи, инфракрасные лучи, видимые и ультрафиолетовые лучи, микроволновое излучение и радиочастоты. Метод абсорбционной спектроскопии основан на взаимодействии электромагнитного излучения с веществом.

В зависимости от объекта исследования спектроскопия подразделяется на атомную и молекулярную. Атомная спектроскопия изучает строение и свойства атомов, молекулярная - строение и свойства молекул. Методом спектроскопии является спектральный анализ. В спектральных методах анализа используется способность атомов и молекул поглощать и испускать электромагнитное излучение.

Инфракрасная спектроскопия - раздел спектроскопии, который включает в себя получение и изучение инфракрасных спектров. Инфракрасная спектроскопия занимается, главным образом, изучением молекулярных спектров испускания, поглощения и отражения, так как в инфракрасной области расположено большинство колебательных и вращательных спектров молекул. Инфракрасная спектроскопия является такой же специфической характеристикой, как отпечатки пальцев человека. По спектрам вещество может быть идентифицировано, если его спектр известен. Метод инфракрасной спектроскопии позволяет определить состояние воды в минерале, характер изоморфных примесей, степень структурной упорядоченности, отнесение минералов к определённому структурному типу и др.

Основные характеристики электромагнитного излучения

Электромагнитное излучение имеет следующие основные параметры: длина волны λ , частота ν или волновое число и соответствующая им энергия излучения E .

Длина волны есть расстояние, которое проходит волна за время одного периода. Основными единицами измерения длин волн в УФ и видимой области служат нанометры ($1\text{ нм} = 10^{-9}\text{ м}$), в ИК-области - микрометры ($1\text{ мкм} = 10^{-6}\text{ м}$). Длина волны зависит от показателя преломления среды, в которой распространяется излучение. Скорость распространения излучения в различных средах различна, поэтому для характеристики определённого участка спектра используют частоты или волновые числа, которые не зависят от среды.

Частота излучения ν есть число колебаний в одну секунду; она равна отношению скорости распространения излучения (скорости света c) к длине волны

Частота измеряется в обратных секундах с^{-1} или герцах ($1\text{ Гц} = \text{с}^{-1}$).

Волновое число показывает, какое число длин волн приходится на 1 см пути излучения в вакууме и определяется соотношением. Размерность волновых чисел - см^{-1} . Волновое число связано с частотой излучения: $\nu = c \cdot \tilde{\nu}$, где c - скорость света в вакууме ($c \approx 3 \times 10^8\text{ м/с}$).

Таблица 3.1

Длины волн электромагнитного излучения

Вид излучения	Диапазон длин волн
Гамма-излучение	10^{-2} нм
Рентгеновское	10^{-2} - 1 нм
Ультрафиолетовое	5-400 нм
Видимое	400-750 нм
Инфракрасное	760 нм - 300 мкм
Микроволновое	300 мкм - 300 мм
Радиоволны	От 300 мм до нескольких километров

Энергия излучения $E = h \cdot \nu$, где h - постоянная Планка ($h = 6,62 \times 10^{-31}\text{ Дж}\cdot\text{с}$). Набор длин волн (или частот) представляет собой спектр излучения. Деление электромагнитного спектра на ряд областей (табл. 1.1) не является

резким и связано, главным образом, со способом получения и регистрации излучения различных длин волн (или частот) и с использованием различных оптических материалов.

Метод ИК-спектроскопии

Оптические спектры молекул получаются при изменении трех видов внутренней энергии молекул: энергии электронов; энергии колебания атомов в молекуле относительно некоторого положения равновесия; энергии вращения всей молекулы, подобно волчку, вокруг своей собственной оси, то есть

$$E = E_{\text{эл}} + E_{\text{к}} + E_{\text{вр}}$$

Каждому из этих видов внутренней энергии для молекул данного вещества соответствует свой набор энергетических уровней. Расстояние между уровнями, их количество и относительное расположение полностью определяется строением молекул вещества.

Возбуждая тот или иной вид внутренней энергии молекул, получают молекулярные спектры: вращательные; колебательные; электронные.

Для возбуждения вращательного спектра нужна небольшая энергия - 0,005 - 0,025 эВ, для колебания атомов в молекуле - 0,05 - 0,5 эВ, для возбуждения электронных спектров - 5 - 10 эВ. Однако в чистом виде не удастся получить электронные и колебательные спектры. Одновременно с возбуждением колебаний атомов изменяется и скорость вращения всей молекулы. Поэтому спектр получается колебательно-вращательным.

Анализ по молекулярным спектрам поглощения основан на использовании закона Бугера-Ламберта-Бера.

Для получения спектров поглощения надо на вещество направить излучение, необходимое для возбуждения того или иного вида внутренней энергии.

Возбуждение электронных спектров осуществляется ультрафиолетовым и видимым излучением, колебательные спектры требуют квантов ИК-излучения, вращательные - квантов микроволнового излучения или дальнего ИК-излучения.

В методе ИК-спектроскопии наиболее широкое распространение получило исследование ИК-спектров поглощения, возникающих при прохождении ИК-излучения через вещество. Каждое вещество имеет свой колебательный спектр. Число полос поглощения в спектре, ширина, форма, интенсивность определяются структурой и химическим составом вещества. Это дает возможность по ИК-спектрам проводить качественный и количественный анализы вещества во всех агрегатных состояниях.

Качественный анализ

Для проведения качественного анализа проб по инфракрасным спектрам необходимо провести интерпретацию инфракрасного спектра. При этом необходимо сочетание экспериментальных данных с теоретическим расчетом. Изучение инфракрасных спектров веществ в настоящее время проводится двумя методами: выявлением характеристических частот и сравнением спектров сложных веществ со спектрами индивидуальных соединений.

Метод характеристических частот.

Молекулы, имеющие одни и те же химические группы, часто имеют одинаковые частоты в спектре. Эти частоты называют характеристическими. Расшифровка инфракрасного спектра производится следующим образом: идентификацию полос поглощения начинают с наиболее сильных и высокочастотных полос в области валентных колебаний ОН-связи. По таблицам характеристических частот полосу поглощения относят к колебанию конкретной связи. Наличие той или иной связи подтверждают деформационной полосой поглощения, относящейся к данной связи.

Метод сравнения.

Идентификация неизвестного соединения по инфракрасному спектру осуществляется сравнением его спектра с эталонными спектрами. Для этого необходима обширная картотека эталонных спектров; при этом важнейшим фактором является стандартность условий их регистрации. В настоящее время имеются многочисленные атласы органических и неорганических соединений.

Идентификация веществ по инфракрасному спектру является полностью достоверной только при точном совпадении изучаемого спектра со спектром эталона по положению (частоте), форме и относительной интенсивности всех полос, то есть всей спектральной кривой.

ИК спектры образцов снимали на ИК-фурье спектрометре фирмы «Perkin-Elmer», модель 2000, в таблетках **ТТТ** (5 мг вещества на 200 мг **ТТТ**) Таблетку получают прессованием на прессформе, число сканирований-50.

2.2. Вискозиметрический метод определения содержания пектина .

Метод основан на гидролизе пектина ферментным препаратом и определении степени его расщепления по величине снижения вязкости.

Сухой вискозиметр Освальда с диаметром капилляра 0.8 мм помещают в водяную баню с температурой 30 °С. Пипеткой вводят в него 10 см³ 1%-ного раствора пектина. Через 5 мин вводят необходимое количество дистиллированной воды. Общий объем реакционной смеси в вискозиметре должен быть равен 15 см³.

В большинстве случаев при анализе активных препаратов на определение берут растворы с таким разбавлением, что вязкость их практически не отличается от вязкости воды.

Контрольное определение вязкости проводят в том же вискозиметре, что и опытное. Можно использовать и другой вискозиметр, но в этом случае водное число прибора не должно отличаться от опытного более чем на 0,5 с. Водное число вискозиметра, взятое для исследований при температуре 30°С, составляет 30-40с.

Степень гидролиза пектина, определяемую по величине снижения вязкости В (в %), рассчитывают по формуле $V = (t_n - t)100 / (t_k - t_n)$, где t_n – время истечения контрольного раствора пектина с водой, с; t – время истечения опытного раствора (после пектолиза), с; t_n – время истечения воды, с.

2.3. Метод определения вязкости

Приборы для измерения вязкости называют вискозиметрами. Обычно

используют капиллярные вискозиметры. Наиболее распространенные капиллярные вискозиметры применяют для определения вязкости неструктурированных и слабоструктурированных жидкостей. Основным элементом этих вискозиметров является капилляр. Определение вязкости проводят путем измерения времени t течения жидкости от метки a до метки b . Напряжение деформации может задаваться извне путем присоединения штуцера к моностату, в котором создается давление (или разрежение) P_m . Жидкость может вытекать также под действием гидростатического давления: $P_r = rgh$, (2.4.73)

где r – плотность жидкости, g – ускорение свободного падения, h – среднее расстояние между уровнями жидкости в резервуарах A и B .

Вязкость рассчитывают по уравнению Пуазейля:

$$V = \frac{\pi r^4 P}{8\eta l} t, \quad (2.4.74)$$

где V – объем жидкости, вытекающей из капилляра за время t ; P – давление, под действием которого жидкость течет; r – радиус капилляра; l – длина капилляра.

В капиллярном вискозиметре объем жидкости в резервуаре всегда постоянный, поэтому уравнение (2.4.74) приводят к виду

$$\frac{1}{t} = K \frac{P}{\eta}, \quad (2.4.75)$$

где K – постоянная вискозиметра, которую находят при использовании стандартной ньютоновской жидкости.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1.Выделение пектиновых веществ из виноградных и яблочных выжимок.

Пектиновые вещества входят в состав клеточной стенки сурединных пластинок, цитоплазмы растительных клеток. Они присутствуют практически во всех высших растениях. Выполняя, благодаря своим специфическим свойствам, ряд важных функций (регулировка водного режима тканей, транспорт водного тока и другие), участвуют в процессах растяжения клеточных стенок.

Согласно современным представлениям пектин имеет линейную структуру. Основой пектиновых веществ является молекулярная цепь из остатков Д - галактуроновой кислоты, имеющих пиранозную конфигурацию и соединенных 1,4 - α - гликозидной связью (28,50,51).

Многоплановый спектр, свойств присущий пектину обуславливает его широкое применение в медицинской и пищевой промышленности. Наиболее перспективно его использование при производстве изделий лечебно-профилактического назначения. Производство пектина основано на использовании яблочных выжимок и свекловичного жома. В нашу задачу входило исследование виноградных и яблочных выжимок, являющегося вторичным сырьем промышленной переработки плодов на сок и вино, в качестве источника пищевого пектина.

Физико-химические свойства пектина, его дальнейшее применение зависят от качества используемого растительного сырья, условий экстракций пектина из этого сырья, также от баланса функциональных групп.

Для выделения пектиновых веществ из виноградной выжимки 50 г измельченного сырья, просеянного через сито №2, экстрагировали смесью 0,5%-ных растворов щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1) дважды (500 и 300мл) при температуре 85⁰ (водяная баня), экстракты объединяли, упаривали, диализовывали в проточной воде, центрифугировали (10мин, 6000 об/мин), снова упаривали и осаждали спиртом. Выпавший осадок отделили

центрифугированием (6000 об/мин, 10мин), высушивали спиртом, выход: 2,1г (4,2%).

Для выделения пектиновых веществ из яблочных выжимок также 50 г нарезанного сырья замачивали 200мл воды в течение суток, затем прибавили 200 мл смеси 1% растворов щавелевой кислоты и оксалата аммония; взятых в соотношении 1:1, и экстрагировали на водяной бане при 85° С в течение 1,5-2час. Затем экстракт отделили и остаток сырья последовательно экстрагировали смесью 0.5%-ных растворов щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1) в тех же условиях, дважды; экстрагента брали 300 и 300мл. Экстракты объединяли, упаривали, диализовали против проточной воды (2 суток), центрифугировали, упаривали, доводили объем до 80 мл и осаждали спиртом (1:5), т.е. 400мл осадок отделили фильтрованием, высушивали спиртом; выход-1,87г (3,74%)

3.2. Гидролиз пектиновых веществ .

0,1г ПВ гидролизовали 4мл 2 н H_2SO_4 , 24 часа при 100° в запаянной ампуле. Затем ампулу вскрывали, содержимое переносили в стакан и нейтрализовали $CaCO_3$, затем раствор отфильтровали и деионизировали катионитом КУ-2(H⁺), гидролизат упаривали и анализировали бумажной хроматографией нисходящим методом. Бумага-Filtrak-FN-18. Для хроматографии использовали систему бутанол-1-пиридин-вода (6:4:3). Время хроматографирования-18 час. Хроматограмму по истечении данного времени высушивали, опрыскивали проявителем анилин-фталат кислый, высушивали и проявляли в сушильном шкафу при 110°С.

В составе виноградных пектиновых веществ обнаружили следующие моносахариды: уроновые кислоты, галактозу, глюкозу, ксилозу и арабинозу, рамнозу; глюкоза, ксилоза находятся в значительных количествах.

Бумажных хроматографиях определили следующие моносахариды. Моносахаридный состав ПВ яблочных выжимок представлен уроновыми кислотами, галактозой, глюкозой, арабинозой, ксилозой и рамнозой. Ксилоза

и рамноза находится в незначительных количествах.

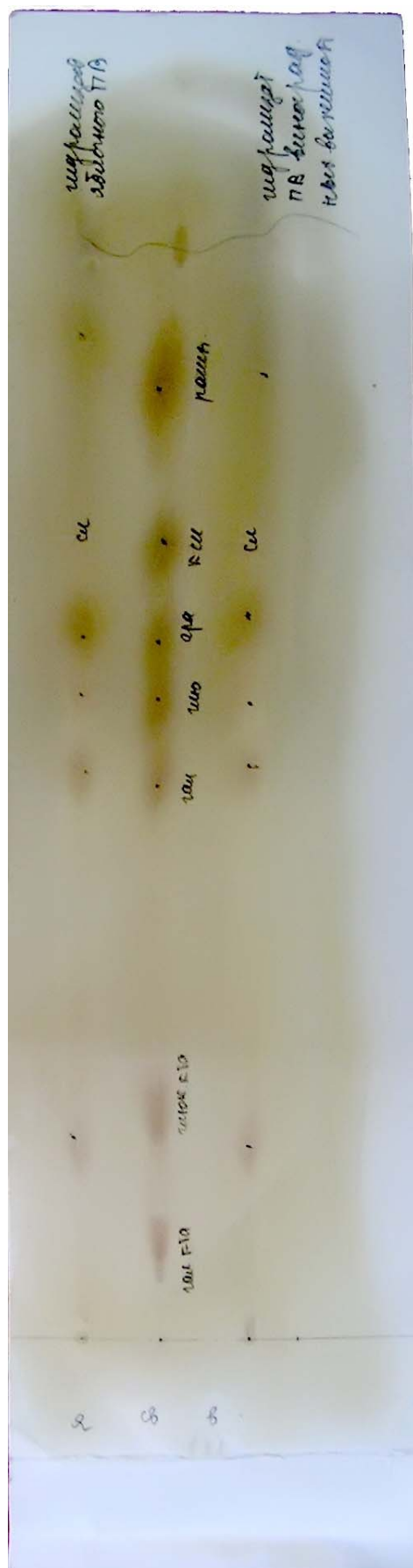


Рис. 3.2.1. Бумажная хроматограмма гидролизатов яблочного (I) и виноградного (II) ПВ.

Контроль: Известные моносахариды: галактуроновая кислота, глюкуроновая кислота, галактоза, глюкоза, арабиноза, ксилоза, рамноза.

3.3. Определение титрометрических показателей ПВ

Для определения степени этрификации проводится определения титрометрических показателей пектиновых веществ.

Свободные карбоксильные группы-Кс 0,1г ПВ смачивали спиртом (во избежание комкования), прибавили 20мл воды нагревали при 40 до полного растворения, перемешивали, выдерживали 2 часа и титровали 0,1н раствором NaOH(индикатор-фенол-фталеин) до слабо-розовой окраски. Содержание свободных карбоксильных групп-Кс вычислили по формуле:

$$K = \frac{a}{p} \cdot 0,45$$

а-количество 0,1н NaOH, израсходованное на титрование (1мл NaOH соответствует 0,0045г карбоксильных групп)

р-навеска пектина, г =0,1г

а =1мл

$$K_c = \frac{1 \cdot 0,45}{0,1} = 4,5 \%$$

-Этрифицированные карбоксильные группы Кэ определили следующим образом к пробе, нейтрализованной при определении Кс, добавляют пипеткой точно 5мл 0,1н NaOH, закрывают пробкой и оставляют на 2 часа при комнатной температуре для омыления метоксилированных групп. Затем вносили точно 5мл 0,1н HCl и ее избыток оттитровывали 0,1н раствором NaOH.

Количество 0,1н NaOH, затраченное на второе титрование соответствовало количеству этрифицированных COOH в исследуемой пробе.

$$K_э = \frac{B}{p} \cdot 0,45 \%$$

В-количество 0,1н NaOH, необходимое для второго титрования,

P-навеска ПВ,г.

V=1.25мл; P=0,1г

$$K_э = \frac{1,25 \cdot 0,45}{0,1} = 5,62 \%$$

Общее количество карбоксильных групп (K_о) равно сумме свободных и этерифицированных групп: K_о=K_с+K_э=4,5+5,62=10,12 %

Степень этерификации (Ст.Э.или λ) показывает количество этерифицированных карбоксильных групп в % от всех карбоксильных групп:

$$\lambda = \frac{K_э}{K_о} \cdot 100 \%$$

$$\lambda = \frac{5,62 \cdot 100}{10,12} = 55,53 \%$$

$$K_с = \frac{0,4 \cdot 0,45}{0,1} = 1,8 \%$$

$$\left[\begin{array}{l} a = 0,4 \text{ мл } 0,1 \text{ NaOH} \\ p = 0,1 \text{ г} \end{array} \right.$$

$$K_э = \frac{2,3 \cdot 0,45}{0,1} = 10,35 \%$$

$$b=2,3$$

$$K_о = K_с + K_э = 1,18 + 10,35 = 12,15 \%$$

$$p=0,1 \text{ г}$$

$$\lambda = \frac{10,35}{12,15} \cdot 100 = 85,18 \%$$

$$85,18 \% - \lambda$$

3.4. Определение показателя вязкости.

Растворы пектиновых веществ отличаются значительной вязкостью. Это является важным показателем, так как между вязкостью и желирующей способностью пектина существует определенная зависимость. Также вязкость пектиновых растворов зависит от молекулярной массы пектиновых веществ.

0,1 пектина (яблочного и виноградного) растворили в 10 мл воды при слабом нагревании.

ПВ виноградных выжимок быстро растворяется в воде. ПВ-яблочных выжимок медленно растворяется в воде с образованием густого раствора.

Вязкость ПВ измеряли в вискозиметре Освальда с $D=0,73$

Время прохождения воды в вискозиметре равно 35' (35сек).

1% раствор ПВ виноградных выжимок протекает за 55 сек.

1% раствор ПВ яблочных выжимок был настолько густой, что использовали концентрацию раствора равную 0,5%- протекании проходит за 11'35 (11мин, 35сек) или 695 сек.

Относительную вязкость растворов ПВ вычисляли по формуле:

$$\eta_{\text{отн}} = \frac{t_1}{t_2}$$

t_1 - время прохождения растворителя, т.е. воды

t_2 - время протекания раствора ПВ

$$\eta_{\text{отн}} = \frac{55}{35} = 1,57 \quad \text{для 1\% раствора ПВ – виноградных выжимок}$$

$$\eta_{\text{отн}} = \frac{695}{35} = 19,85 \quad \text{для 0,5\% раствора ПВ яблочных выжимок}$$

Из полученных данных видно, что ПВ яблочных выжимок имеют высокий показатель относительной вязкости при сравнении с таковым ПВ виноградных выжимок.

3.5. ИК-спектроскопия

Пектиновые вещества, выделенные из растений, имеют основную цеп, в состоящую из остатков D-галактуроновой кислоты, соединенных α -1 \rightarrow 4 гликозидными связями. Боковые цепи состоят из нейтральных моносахаридов. Часть гидроксильных групп в ПВ может быть

ацетилирована, а карбоксильные группы – этерифицированы метиловым спиртом. Благодаря такому разнообразию группировок ИК-спектры пектиновых веществ довольно сложны.

Рассматриваем в данном случае спектр ИК ПВ яблочных и виноградных выжимок, которые представляют собой кислую соль частично метилированной пектовой кислоты с боковыми цепями-нейтральными моносахаридами. В таком виде ПВ экстрагируются из растительных объектов. Проанализируем характерные для них полосы поглощения ИК спектрах ПВ виноградных выжимок по мере уменьшения частоты.

В ПВ виноградных выжимок интенсивная полоса с максимумом в районе 3360 см^{-1} показывает наличие валентных колебаний гидроксильных групп (рис1).

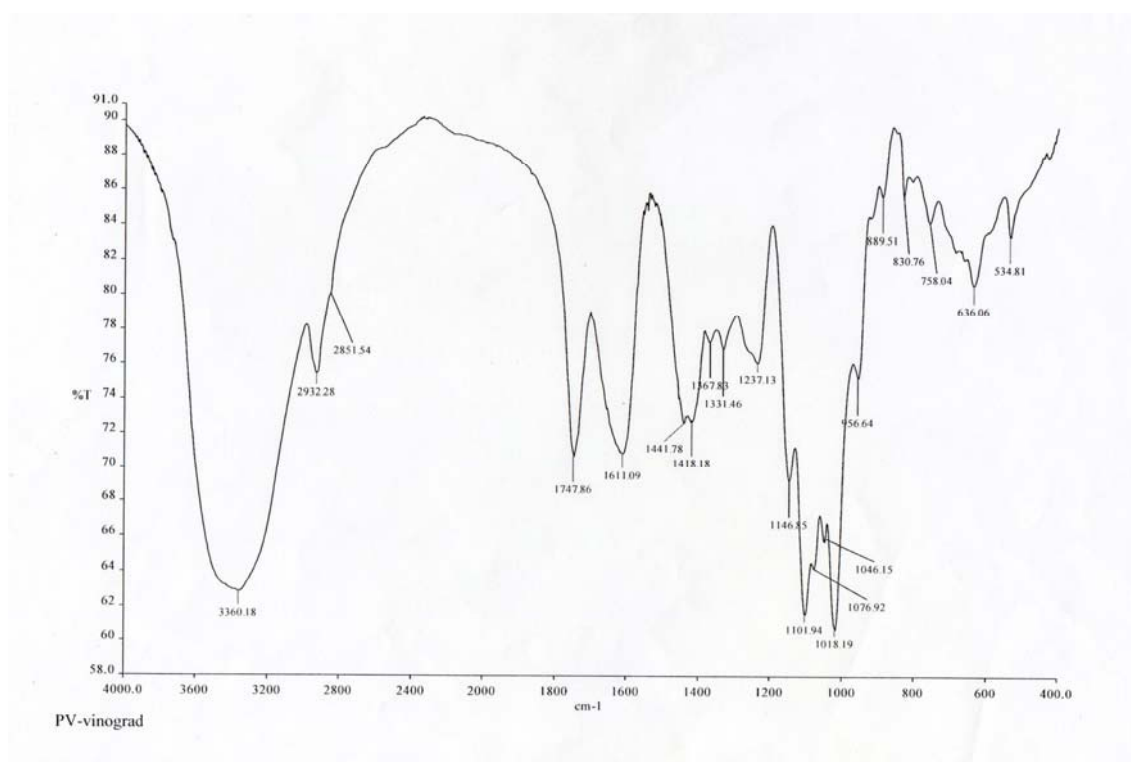


Рис.3.5.1. ИК-спектр ПВ виноградных выжимок

Полоса средней интенсивности в области 2932 см^{-1} показывает наличие валентных колебаний СН групп ПВ. Интенсивность этой полосы характеризует метилирование карбоксильной группы.

В отличие от нейтральных полисахаридов для ПВ характерны интенсивные полосы, соответствующие валентным колебаниям карбонил

корбоксильных групп (C=O).

Полосы колебаний ионизированного корбоксила находятся в области 1611 и 1418 см⁻¹, что характерно для всех солей ПВ. В зависимости от природы иона металла, заместившего водород в корбоксильной группе, их положение в спектре меняется.

При метилировании корбоксила появляются слабые по интенсивности полосы 1441 и 1367 см⁻¹. В интервале 1200-1400 см⁻¹ лежит группа мало интенсивных полос. Особенна стабильна частота 1331 см⁻¹, природа которой связана с деформационными колебаниями гидроксильных групп пиранозных циклов.

Группа интенсивных полос на участке спектра ПВ 1046-1237 см⁻¹ относится к валентным колебаниям (C-C) и (C-O) пиранозных циклов и (C-O-C) эфирных мостиков.

Следует отметить еще некоторые полосы поглощения в ИК-спектрах ПВ, которые также дают важную информацию об их строении и свойствах.

Триплеты пиранозных – 815, 830 и 910 см⁻¹ – указывают на наличие 1-4 гликозидной связи между остатками Д-галактуроновой кислоты, находящейся в α-конфигурации. Полоса поглощения при 889 см⁻¹ свидетельствует о присутствии β-гликозидной связи, что возможно для остатков нейтральных моносахаридов.

А полоса 956 см⁻¹ отражает деформационные колебание метильных метиленовых групп. Полосы поглощения, расположенные в низкочастотной области 758, 636, 534 см⁻¹ соответствует колебаниям C-C, C-O-C и др. связей пиранозных циклов.

Анализируя ИК-спектр ПВ яблочных выжимок, следует отметить его сходство с таковым виноградных выжимок. Основная разница заключается в интенсивности полос поглощения, что связано с показателями титрометрического анализа, моносахаридным составом.

Полоса поглощения при 3425 см⁻¹ отражает валентные колебания гидроксильных групп, она обычно бывает интенсивной (рис 2).

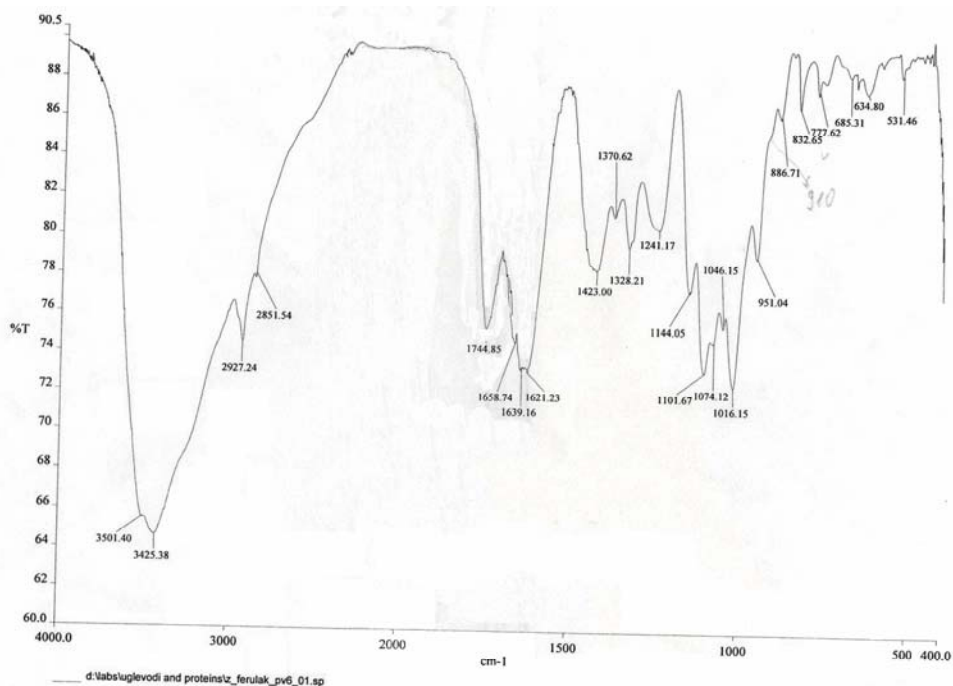


Рис.3.5.2. ИК-спектр ПВ яблочных выжимок

Менее интенсивная полоса 2927cm^{-1} показывает валентные колебания СН-групп, при метилировании карбоксильной группы поглощение значительно возрастает.

Достаточно хорошо выражена полоса поглощения при 1744cm^{-1} , являющаяся характерной для кислых полисахаридов и пектиновых веществ, имеющих основную полисахаридную цепь, состоящую из остатков Д-галактуроновой кислоты. Эта полоса соответствует колебанию карбонила карбоксильной группы.

В спектрах пектиновых веществ и их метильных производных в виде выступа проявляется слабое поглощение воды -1639 (~ 1640) cm^{-1} . А присутствие таких полос как 1621 и 1423cm^{-1} подтверждает наличие

ионизированной карбоксильной группы, связанной с металлами, что свойственно карбоксиполисахаридам.

Кроме того, для карбоксиполисахаридов, т.е. для ПВ характерно наличие эфирных групп, чаще всего метильных и тогда в спектре присутствует частота внутренних деформационных колебаний метильной группы при 1370см^{-1} . Полосы поглощения в области 1328 и 1241 см^{-1} вызваны колебаниями сложноэфирной, метильной и гидроксильной групп.

Ряд полос поглощения в области $1000-1150$ ($1016, 1046, 1074, 1101, 1104$) представляет собой валентные колебание пиранозного цикла (С-С, С-О, С-О-С), эти полосы характерны и для других полисахаридов нейтрального характера.

Далее в ИК спектре яблочного ПВ следует полоса поглощения 931см^{-1} , которая отражает деформационные колебание метильных и метиленовых групп. Следующие две полосы являются характерными для ИК-спектров ПВ: 886см^{-1} полоса, характеризующая $1\rightarrow4$ тип гликозидной связи; 832см^{-1} -показывает α -конфигурацию этой связи.

Полосы поглощения, расположенные в низкочастотной области $777, 685, 634$ и 531 см^{-1} соответствуют колебаниям С-С-О, С-О-С и другим связям пиранозных циклов.

Таким образом, изучение ИК-спектров ПВ яблочных и виноградных выжимок дает информацию, т.е. идентификацию и характеристику этих высокомолекулярных карбоксилсодержащих полисахаридов.

3.6. Физико-химические свойства пектинов виноградных и яблочных выжимок

Для рационального использования пектина и пектин содержащего сырья в пищевой промышленности необходимо всестороннее изучение его физико-химических свойств. В зависимости от целей выделение пектина можно вести по двум направлениям: получение технологического пектина, удовлетворяющего требованиям соответствующей отрасли промышленности;

выделение пектиновых веществ для исследования строения и состояния в клетках растений. Молекулярный вес пектиновых веществ выжимков винограда определяли седиментационным методом, он находится в пределах 26000-31100.

Физико-химические свойства пектина, его дальнейшее применение зависят от качества используемого растительного сырья, условий экстракций пектина из этого сырья, также от баланса функциональных групп.

В таблице 3.6.1. представлены физико-химические показатели яблочного и виноградного пектина в сравнении со яблочным.

Таб. 3.6.1. Физико-химическая характеристика пектинов

Показатель	Количественные характеристики пектинов	
	Виноградный	Яблочный
Растворимость, % в воде в HCl	100 95	100 100
Зольность, %	2.2	1.2
Влажность, %	5.3	7.8
Метоксильные группы, %	4,2	5,3
Ацетильные группы, %	1.2	2.6
Свободные карбоксильные группы, %	4,5	1.7
Этерифицированные карбоксильные группы	5,6 85,15	10,5 55,53
Степен этрификации		
Молекулярный вес	26000-31100 Да	80000-90000 Да
pH 1% раствора	2.3-3.6	4.1

Таким образом пектины полученные с такими физико-химическими характеристиками, хорошо растворяются в воде, имеют хорошие показатели по степени этрификации, молекулярным весом и растворимостью. Что позволяет считать их рекомендовать для применения в народном хозяйстве.

ВЫВОДЫ

1. Таким образом из яблочных и виноградных выжимок выделении пектиновые вещества с выходом 3,74 и 4,2 %

2. Методом кислотного гидролиза установлен качественный моносахаридных состав ПВ: галактурановая кислота, галактоза, глюкоза, арабиноза, ксилоза и рамноза, находящиеся в разных соотношениях.

3. Выделенные ПВ яблочные и виноградные хорошо растворяются в воде и имеют показатель относительной вязкости: 1,57, 19,85 соответственно.

4. Данные титрометрических показателей позволили отнести изучаемые ПВ к высокоэтирифицированным (ПВ виноградный, ПВ яблочный).

5. Данные ИК –спектрокопии позволили установить строение изучаемых ПВ, в которых основную цепь составляет остатки Д-галактурановой кислоты, соединенных α -1 \rightarrow 4 гликозидными связями.

Таким образом, полученные данные дают возможность рекомендовать использование яблочного ПВ и виноградного ПВ для пищевых целей при изготовлении кондитерских изделий (напитки, мармелад, желе, зефир, хлебо-булочных изделий) и для медицинских целей (адсорбент при отравлении тяжелыми металлами, облучении радионуклидами).

ЛИТЕРАТУРА

1. Учебное пособие по изучению доклада Президента Республики Узбекистан Ислама Каримова на заседании Кабинета Министров, посвященном основным итогам 2011 года, на тему «2012 йил Ватанзимиз таракқиётини Янги босқичга кўтарадиган йил бўлади». Ташкент - «O`qituvchi» НМИУ. 2012. 272 с.
2. А.Судзуки, Патент Японии 60-043445 (1996), ИСМ, № 9 (1997)
3. Б.Л.Жубанов, Е.О.Батырбеков, Л.Б.Рухина, Р.Б.Исхаков и др., Изв. АНРКаз., сер. хим., №2, 14 (1997)
4. Н.С.Карпович, Л.В. Донченко, В.В.Нелина, Пектин. Производство и применение, Урожай, Киев, 1989, 12
5. У.Н.Мусаев, О.А.Шабанова, Узб. хим. журн., № 2, 38 (1998)
6. Н.П.Шелухина, Р.Ш.Абаева, Г.Б.Аймухамедова, Пектин и параметры его получения, Илим, Фрунзе, 1987, 12
7. А.Судзуки, Х.Ниномия, Патент Японии 60-049724 (1994), ИСМ, № 12 (1997)
- 8.74. С.Ш.Рашидова, Л.Н.Семенова, Б.Д.Кабулов, С.А.Васильева, К. Т. Норкуллова, Патент РУз 3792 (1996), Ахборотнома, №3 (1996)
9. С.Ш.Рашидова, Л.Н.Семенова, Н.Л.Воропаева, И.Н.Рубан, Ш.Ш.Шавахабов, Э.Г.Потиевский, Л.Л.Сольская. Патент РУз 4719(1997). Ахборотнома, № 4 (1997)
10. С.Ш.Рашидова, Л.Н.Семенова, М.Р.Кадырханов, Н.Л.Воропаева, И.Н.Рубан, *Исследование физико-химических и конформационных характеристик лимонных пектинов, XVI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии*, Москва, 454 (1998)
11. С.Ш.Рашидова, Б.Д.Кабулов, Л.Н.Семенова, И.Л.Новосельская, Деп. рук.

№ 2442-Y395.

12. A.Darvill, M.McNeill, P. Albersheim, D.P.Delmer, N.E.Tolbert(Ed.), *The Plant Cell.*, Acad. Press, New York., 91 (1990)
13. J.R.Thomas, M.McNeill, P.Albersheim, *Plant. Physiol.*, 83,653 (1987)
14. J.R.Thomas, A.Darvill, P.Albersheim,*Carbohydr. Res.*, 185,261 (1989)
15. C.D.May, *Carbohydr. Polym.*, 12, 79 (1990)
16. W. P i I n i k, *Gum and Stabilizers for the Food Industries*, 5, Oxford Univ. Press., London, 209 (1990)
17. J.F.Tibolt, C.M.G.C.Renard, M.A.V.Axelos, P.Roger, M.J.Crepeau, *Carbohydr. Res.*, 238, 271 (1993)
18. F.M.Rombout, J.F.Tibolt, *Carbohydr. Res.*, 154, 189 (1986)
19. D.A.Powell, E.P.Morris, M.J.Gidley et al., *J.Mol. Biol.*, 155,517(1982)
20. D.Zhan. O.Hanssen, A.J .Mort, *Carbohydr. Res.*,308, 373 (1998)
21. A.G.Darvill, M.McNeill, P.Albersheim, *Plant. Physiol.*, 1978,62,418(1978)
22. H.Yamado, M.Hirano, H.Kiohara, *Carbohydr. Res.*, 219, 173 (1991)
23. E.Zablackis, J.Huang, B.Muller, A.Darvill, P. Albersheim,*Plant. Physiol.*, 1995,107, 1129(1995)
24. T.Ishii, T.Matsunaga, *Carbohydr. Res.*, 284, 1 (1996)
25. T. Doco , P.Williams, S.Vidal, P.Pellerin, *Carbohydr. Res.*, 297,181 (1997)
26. M.A.O'Neill, D. Warr e n fel t z, K.Kates, P.Pellerin, T.Doco, A.G.Darvill, P. Albersheim, *J.Biol. Chem.*, 271, 22923 (1996)
27. P.Peng, R.Zhou, Z.Tang, Y.Zhao, *Tianran khanwu Yanjiu Yu Kaifa.*, 6, 52 (1994)
- 28.35. P.Pellerin, S.Vidal, P.Williams, J.M. Brielouet, *Carbohydr. Res.*, 1995, 277, 125 (1995)
29. N.Arslan, T.Asan, *Turk. J. Eng. Environ.*, 18,453 (1994)
30. H. Abramovic, C. Klofutar, *Acta chim. Slov.*, 1997, 44, № 1,273.
ofcitrus plants pectins, *Third Int. Symp. on the Chem. of natural compounds*, Abstract, Uzbekistan, Bukhara, PL 5 (1998)
31. G.Berth, H.'Dautsenberg, G.Rother, *Carbohydr. Polym.*, 25, 177 (1994)

32. G.Berth, H.Dautsenberg, G.Rother, Carbohydr. Polym., 25, 187 (1994)
33. N.C.Carpita, D.M.Gibeaut, Plant. J., 3, 31 (1993)
34. L.Alagna, T.Rosperi, A.G.Tomlinson, R.Rizzo, J. Phys. Chem., 90, 6853 (1986)
- 35 V.M.Dronnet, C.M.G.Renard, M.A.V.Axelos, J.-F.Thibault, Carbohydr. Polym., 30, 253 (1996)
36. N.Welner, M.Kacurakova, A.Malovikova et al., Carbohydr. Res., 308, 123 (1998)
37. L.Catoire, C.Derouet, A.M.Redon et al., Carbohydr. Res., 300,19 (1997)
38. Food Chemical Codex, FCC 111, Monographs Natural., Acad. Press., Wash., DC, 215 (1981)
39. A.G.J.Voragen, H.A.Schols, W.Pilnik, Food Hydrocol., 1, 65 (1986)
- 40.. A.Ploger.y. Food. Sci., 57, 1185 (1992)
- 41.. N.Blumenkrantz, G.Asboe-Hansen,Anal.Biochem., 54, 484 (1973)
42. R.Weinberger, Practical Capillary Electrophoresis, Acad. Press, San Diego, C A, (1993)
43. H.J.Zhong, M.A.K.Williams, D.M.Goodal, M.E.Hansen, Carbohydr. Res., 308, 1 (1998)
- 44.. F.A.Graves, L. Ham, Патент США 5354851 (1993), ИСМ, №23(1995)
45. I.Eriksson, R.Andersson, P. Aaman, Carbohydr. Res., 301, 177 (1997)
46. C.E.M.Quijano, S.C.M.Nejia, Rev. Soc. Quim. Mex., 36, 203 (1992)
47. L.Cheng, P.H.Kindell,Carbohydr. Res.,301,205 (1997)
48. M .Kratchano va, I.Panchev, E.Pavlova, L. Shtereva, Carbohydr. Polym., 25, 141 (1994)
49. J.Wang, W.Zhang,XiandaiHuagong, 14,21 (1994)
50. S.Dela Motte, S.Boese-O'Reily, M.Heinish, F.Harrison, Arzneim. Forsch., 47, 1247 (1997)
51. K.Murai, K.Kobayashi, K.Tazawa , H.Ogami, I.Yamashita, T.Shimizu, M.Fujimaki, Патент Японии 07-109226 Chem. Abstr., 123,47902 (1995)
52. H.Inohara, A.Raz, Glycoconjugate J., 11, 527 (1994)
53. O.Munjeri, P.Hozda, E.E.Osim, C.T. Musabayane, Y. Pharm.Sci., 87, № 8, 905

(1998)