Областное государственное бюджетное учреждение
дополнительного образования
«Детский эколого-биологический центр»

Региональный трек (конкурс)
Всероссийского конкурса научно-технологических проектов
«Большие вызовы»

Направление: Агропромышленные и биотехнологии

Выделение свекловичного пектина и исследование его свойств

Автор работы: Панина Елена Андреевна, 10 класс, обучающаяся объединения «Биоолимп» ОГБУДО «ДЭБЦ»
Руководитель: Ламзов Денис Сергеевич, заведующий лабораторией естественных наук ОГБУДО «ДЭБЦ»

Рязань, 2022

Содержание

Введение ……3

1. Обзор литературы. Характеристика пектинов …… 4

1.1. Номенклатура и химическая структура пектиновых веществ …….. 4

1.2. Методы определения пектиновых веществ ……. 5

2. Экспериментальная часть ……. 5

2.1. Объект исследования ……. 6

2.2. Общие аналитические методы исследования ……. 6

3. Результаты исследования …… 8

3.1. Получение пектина из свекловичного жома ……. 9

Заключение ……. 11

Выводы …… 12

Список использованных источников …… 12

Введение

В настоящее время исследование свойств пектинов занимает особое место в биохимической науке и биотехнологии. Они представляют собой полисахариды, состоящие из α-1,4-связанных остатков D-галактуроновой кислоты и α-1,2-рамнозных звеньев, а также большого количества нейтральных сахаров, включая арабинозу, галактозу и меньшее количество других сахаров [4]. Пектиновые биополимеры обладают уникальными биологическими и функциональными характеристиками, которые обуславливают значимость пектинов для окружающей среды, а также находят большое применение в современном мире: в пищевой, медицинской, косметологической отраслях, что подчеркивает актуальность данной темы.

Преимущество отдаётся сырью, которое подходило бы для промышленного производства с точки зрения экономической целесообразности. Коммерческий пектин получают из яблочных и цитрусовых выжимок. В Российской Федерации имеется богатая сырьевая база для производства пектинов, но, несмотря на это, их производство на сегодняшний день практически отсутствует в промышленных масштабах. Тем самым это вызывает острую зависимость пищевой промышленности от зарубежных поставщиков продукции.

Химическая модификация пектиновых полисахаридов позволяет получать соединения с новыми физико-химическими и физиологическими свойствами. Пектиновые полисахариды могут быть использованы в качестве органической матрицы для введения в организм необходимых микро- и макроэлементов при различных формах микроэлементозов.

Целью нашей работы является разработка способа получения пектиновых веществ из свекловичного жома в условиях лаборатории центра Гелиос, изучение физико-химических свойств, структурных характеристик выделенного пектина, и получение металлокомплексов цитрусового пектина с ионами железа.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проведение обзора литературы по теме «Химическая структура пектиновых веществ, способы получения и модификации, свойства и применение».
2. Изучение процесса гидролиза-экстракции пектина из свекловичного жома с использованием 0,75%-ого раствора щавелевой кислоты. Проведение аналитических расчётов по определению выхода свекловичного пектина на воздушно-сухую массу сырья.
3. Исследование физико-химических свойств свекловичного пектина, пектата натрия и металлокомплексов пектина с ионами железа.

1. **Обзор литературы**. **Характеристика пектинов**

1.1. **Номенклатура и химическая структура пектиновых веществ**

Пектин – сухой, порошкообразный продукт от светло-бежевого до светло-серого цвета, состоящий преимущественно из частично

этерифицированной метанолом полигалактуроновой кислоты и её натриевых, калиевых, кальциевых и аммониевых солей (рис. 1). Пектин – это полисахарид растительного происхождения [4].

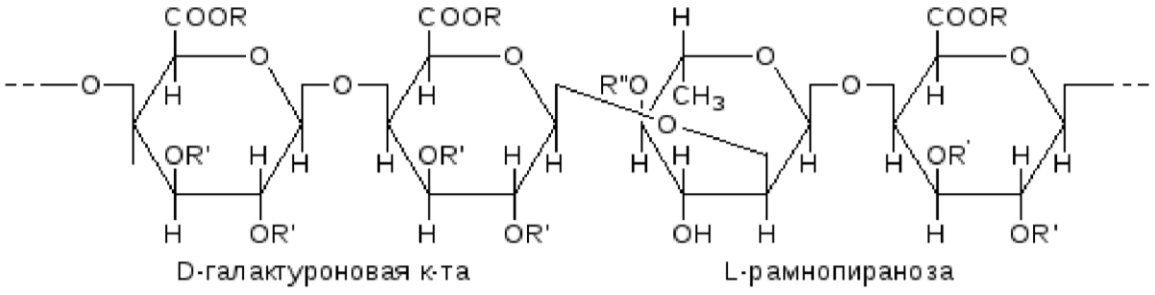

Рис. 1. Химическая структура пектина

Полигалактуроновая кислота – кислота, представляющая собой линейный полимер, молекула которых состоит из связанных 1,4-гликозидными связями остатков α-D-галактуроновой кислоты и некоторого количества остатков L-рамнозы (рис. 2) [4].

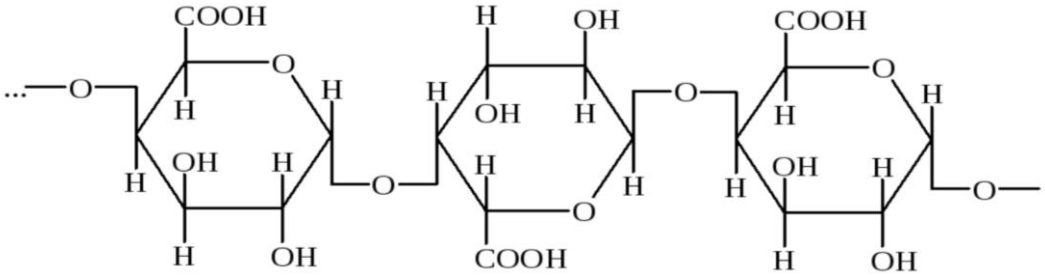

Рис. 2. Химическая структура полигалактуроновой кислоты

Пектиновые кислоты – высокомолекулярные полигалактуроновые кислоты, небольшая часть карбоксильных групп которых этерифицирована метиловым спиртом. Соли пектиновых кислот называются нормальными или кислыми пектинатами [5].

Пектовые кислоты – полностью деметоксилированные пектины с нетронутой цепью. Соли пектовых кислот называются нормальными или кислыми пектатами [5].

В 1848 году Фреми разделил нативный пектин на две фракции – растворимый (гидропектин) и нерастворимый (протопектин) [5].

В зависимости от количества метоксильных групп и степени полимеризации пектины разделяют на высокоэтерифицированные и низкоэтерифицированные. Н-пектин – высокоэтерифицированный, имеет степень этерификации, то есть отношение числа этерифицированных карбоксильных групп на каждые 100 карбоксильных групп пектиновой кислоты, более 50% (рис. 3); L-пектин – низкоэтерифицированный, имеет степень этерификации менее 50% [3].

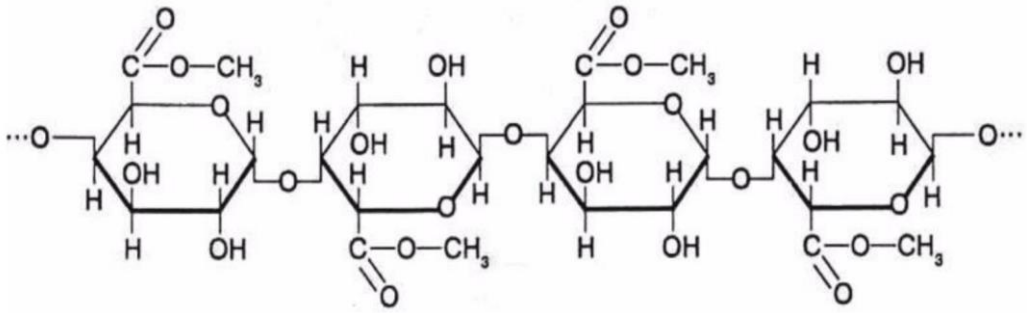

Рис. 3. Химическая структура Н-пектина

1.2 **Методы определения пектиновых веществ**

1) Осаждение спиртом [1].

Пектины осаждаются из раствора при добавлении 2-х или более объёмов этилового спирта. При этом получается прозрачный желатинообразный осадок. В случае сильно разбавленных растворов, или частично деградированных, или имеющих низкую метоксильную составляющую, осадок получается менее желатинообразным. Наиболее полно осаждение происходит при подкислении раствора соляной кислотой конечной концентрации 5%. В некоторых случаях, особенно при осаждении большим количеством спирта (выше 70%), осаждаются и непектиновые вещества: пентозаны, крахмал, растительная камедь. Если осадок отсутствует, значит и пектиновые вещества в исходном растворе тоже отсутствуют.

2) Определение с применением фруктовых соков, богатых танином [1].

Разбавленные экстракты или отжатый сок растений, богатых танином (группа фенольных соединений растительного происхождения, содержащих большое количество групп –ОН), применяются в качестве чувствительных реактивов на пектиновые вещества. Сок зрелых плодов, приготовленный прессованием, кипятится и фильтруется в горячем виде. Полученный реактив стабилен в течение нескольких лет, если его хранить в холодильнике под слоем ксилола. Осаждение пектинов производится следующим образом: к 1 мл реактива прибавляется по каплям 2 мл испытуемого раствора, раствор сначала мутнеет, затем появляется осадок. Метод обнаружения пектиновых веществ не получил широкого распространения из-за того, что ещё недостаточно выяснен механизм и специфичность реакции.

2. **Экспериментальная часть**

Данная работа проведена в лаборатории естественных наук ОГБУДО «Детский эколого-биологический центр» в г. Рязани.

2.1. **Объект исследования**

Объектом исследования в данной работе является свекловичный жом. Из литературы известно [3], что содержание пектиновых веществ в свекловичном жоме колеблется от 20 до 30% на воздушно-сухую массу.

Реактивы: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – сульфат железа, использованный для синтеза натрий-, железо-полигалактуроната (ПГNaFe), NaOH – для синтеза пектата натрия и другие реактивы по степени чистоты имели квалификацию чда.

2.2. **Общие аналитические методы исследования**

2.2.1. Определение влажности

Влажность сырья определяют методом [1], который основан на определении массовой доли влаги путём высушивания образца до постоянной массы. Массовую долю влаги W, %, вычисляем по формуле 1:

$$W = m – m1/m – m2 \cdot 100\%, (1)$$

где m – масса бюкса с навеской до высушивания, г; m1 – масса бюкса с навеской после высушивания, г; m2 – масса пустого бюкса, г.

2.2.2 Определение набухаемости сырья

Отношение массы набухшего изделия к массе сухого характеризует степень его набухания. Коэффициент набухаемости Кн вычисляем по формуле 2 [1]:

$$Кн = m2/m1, (2)$$

где m1 – масса пробы до набухания (без массы чашки), г; m2 – масса пробы после набухания (без массы чашки), г.

2.2.3 Определение зольности

1 г продукта взвешивают в тигле, который предварительно довели до постоянного веса, затем сжигают в муфельной печи при t = 800°С и взвешивают снова [1].

Зольность З, %, вычисляется по формуле 3:

$$З = P1/P \cdot 100\%, (3)$$

где P1 – вес продукта после сжигания, г; P – вес продукта до сжигания, г.

2.2.4 Определение вязкости и молекулярной массы

Для измерения вязкости использовали вискозиметр Оствальда с диаметром капилляра 0,56 мм. Раствор пектина готовили следующим образом: 1 г вещества растворяли в 100 мл дистиллированной H_2O при перемешивании в течение 24 ч. Подготовленный к работе вискозиметр, содержащий определённый объём (16 мл) исследуемого раствора помещали в термостат при t = 20°С на 30 мин. Затем заполняли капилляр и верхний шарик

вискозиметра доводили до соответствующей метки. Определяли время истечения раствора и растворителя, содержащегося в верхнем шарике и заключенного между двумя метками. Подобные измерения проводили 3 раза.

а) высокая вязкость является характерной особенностью растворов пектинов хорошего качества [2, 4].

Кинематическая вязкость жидкости [2] определяется по формуле 4:

$$\eta_{кин} = g/9{,}807 \cdot T \cdot K, \quad (4)$$

где g – ускорение свободного падения в месте измерения, м/с^2; 9,807 – ускорение свободного падения, м/с^2; T – время истечения жидкости, с; K – постоянная вискозиметра, мм^2/с$^{-2}$.

б) показатель отношения времени истечения исследуемого раствора и растворителя характеризует относительную вязкость $\eta_{отн}$ раствора пектина при данной концентрации [2], формула 5 выглядит следующим образом:

$$\eta_{отн} = t1/t0, \quad (5)$$

где t1 – время истечения объема исследуемого раствора, с; t0 – время истечения объема растворителя, с.

Удельную вязкость $\eta_{уд}$ вычисляют из относительной вязкости [2] по формуле 6:

$$\eta_{уд} = (\eta_{отн} - 1), \quad (6).$$

Для растворов высокомолекулярных соединений из всех существующих уравнений зависимости средневесового молекулярного веса от внутренней характеристической вязкости подходит уравнение Куна-Марка [2], формула 7:

$$[\eta] = kM^{\alpha}, \quad (7)$$

где [η] – внутренняя или характеристическая вязкость; k, α – константы, зависящие от структуры полимера и его взаимодействия с растворителем.

Для пектинов по Гликману и Орлову уравнение Куна-Марка, формула 8 [2]:

$$[\eta] = 1{,}1 \cdot 10^{-5} \cdot M^{1{,}22}, \quad (8).$$

При концентрации, стремящейся к 1, используют приведённую вязкость $[\eta]_{привед\ (c = 1)}$, формула 9 [2]:

$$[\eta]_{привед\ (c = 1)} = [\eta]_{уд}/ C, \quad (9).$$

3. **Результаты исследования**

Схема экспериментов для получения свекловичного пектина и комплексов цитрусового пектина с ионами железа представлена на рисунке 1.

Рис. 1.

Выделение пектинов из свекловичного жома проводилось согласно принципиальной схеме (рис. 2).

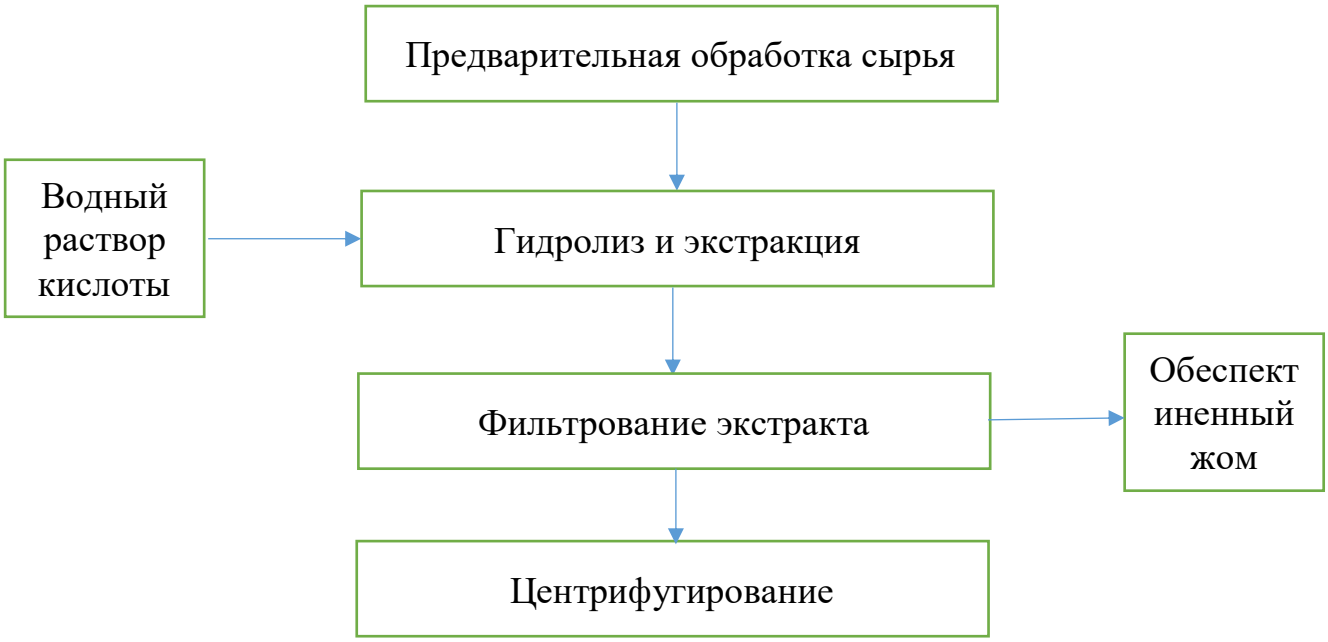

Рисунок 2. Принципиальная схема получения пектина

3.1. **Получение пектина из свекловичного жома**

Предварительная подготовка сырья

В колбу засыпали 60 г свекловичного жома и залили 800 мл дистиллированной водой (1:13). Процесс промывания провели в течение 1 ч на магнитной мешалке при t = 100°C и постоянном перемешивании (350 об/мин). После отделения от промывных вод масса влажного жома составила 292,12 г.

Гидролиз-экстракция пектина

Эксперимент 1. В колбу внесли 149,869 г промытого свекловичного жома и залили 0,75%-ным раствором щавелевой кислоты (ρ = 1,001 г/см^3), V = 800 мл (1:5). Гидромодуль по отношению к влажному сырью – ~1:5. Разделили влажный жом на 2 части для проведения двух опытов (при 65 и 75°C).

Процесс гидролиза-экстракции проводили в течение 7 ч на магнитной мешалке при t = 75°C и постоянном перемешивании (750 об/мин). Для достижения нужной температуры колбу сначала поместили в сушильный шкаф при t = 75°C на 1-1,5 ч, далее поставили на магнитную мешалку.

Отделение экстракта от полученного гидролизата проводили через лавсановую ткань. Процесс концентрирования был проведён на ротационном испарителе при t = 39°C под вакуумом (около 1 ч). Процесс центрифугирования проводили в течение 30 мин при 4000 об/мин на

центрифуге. Осаждение пектина проводили 88%-ным раствором этанола (ρ = 0,834 г/см^3) при соотношении концентрата пектина (190 мл) к объёму этилового спирта (368 мл), равном 1:2. Далее осаждённый пектин поместили в холодильник на сутки. Центрифугированием в течение 30 мин при 4000 об/мин провели процесс отделения скоагулированного пектина. Процесс сушки пектина был проведён в сушильном шкафу при t = 60°C. Процесс измельчения свекловичного пектина провели на шаровой мельнице в течение 3 минут.

Обработка катионитом

В стакан взяли навеску 1 г порошка пектина и добавили 100 мл дистиллированной воды, далее на магнитной мешалке перемешивали (250 об/мин) при t = 50°C до полного растворения, затем добавили 0,5 г катионита.

Влажность свекловичного пектина определяли по формуле 1.

Примеры расчёта:

а) сырья: взяли две навески 5,301 г и 6,137 г и поместили в сушильный шкаф при температуре 103 ± 2 °C. Первое взвешивание проводим через 1 ч, последующие через 20 мин;

б) пектина: навеску пектина взвешивают в бюксе массой 15,3945 г с закрытой крышкой, затем открытую бюксу с навеской помещают в нагретый сушильный шкаф и сушат при температуре 103 °C в течение 1,5 ч. После сушки бюксу закрывают крышкой, помещают в эксикатор на 30 мин для охлаждения и взвешивают повторно. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Масса навески пектина в бюксе до и после высушивания

m1 = 15,3945 г	m2 = 15,6929 г	m3 = 15,6528 г
Δm1 = m2 – m1 = 0,2984 г	Δm2 = m3 – m1 = 0,2583 г	

Массовую долю влажности рассчитываем по формуле 1:

$$W = 0,2984 – 0,2583/0,2984 \cdot 100\% = 10,44\%.$$

Зольность пектина определяют сжиганием высушенного образца в муфельной печи (t = 800°C): взяли навеску пектина 0,30 г (вес продукта до сжигания) и сожгли до 0,01 г (вес продукта после сжигания). Зольность пектина рассчитываем по формуле 3 и получаем значение, равное 4,12%, что в пересчёте на сухое вещество составляет 4,60%.

Определение кинематической вязкости и молекулярной массы пектина

Экспериментальные данные по определению времени истечения исследуемого раствора и растворителя представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты, полученные методом вискозиметрии

Образец	Время истечения, с				Кинематическая вязкость, мм^2/с
	1 измерение	2 измерение	3 измерение	Среднее значение	
Дистиллированная вода	101,54	101,54	101,25	101,44	0,12
1%-ный раствор пектина	295,51	293,87	295,03	294,80	2,19

Кинематическую вязкость жидкости определяли по формуле 4.

Определение молекулярного веса вискозиметрическим методом

Относительную вязкость раствора свекловичного пектина вычисляли по формуле 5:

$$\eta отн = 04.54.80/01.41.44 = 2,91.$$

Удельную вязкость ηуд вычисляли из относительной вязкости по формуле 6:

$$\eta уд = (2,91 – 1) = 1,91.$$

С учётом приведённой вязкости раствора пектина при концентрации равной 1%, рассчитываем молекулярную массу пектинов по преобразованной формуле 7:

$$M = 1,22\sqrt{[\eta]привед/1,1 \cdot 10^{-5}} = 19714, 58.$$

Молекулярная масса свекловичного пектина (75 С) составила ≈ 19,72, т.е. выделенный из свекловичного жома пектин является высокомолекулярным.

Заключение

Проведённый обзор литературы позволил ознакомиться с основными технологическими процессами и перспективными методами получения и модификации пектиновых полисахаридов, методами исследования их свойств в производстве пектиновых веществ и областью применения.

Найдены рациональные параметры процесса гидролиза-экстракции пектина из свекловичного жома: 0,75%-ный раствор щавелевой кислоты, температура 75 °С, гидромодуль 1:5, продолжительность 7 ч, обеспечивающие выход свекловичного пектина на воздушно-сухую массу сырья, равный 12,30%. Экспериментально показано, что повышение температуры на 10 °С при обработке свекловичного жома 0,75%-ным раствором щавелевой кислоты позволяет увеличить выход пектина на воздушно-сухую массу сырья, т.е. повышает эффективность процессов гидролиза-экстракции пектина из свекловичного жома.

Данная работа позволила получить новые знания и опыт, углубить необходимые навыки и повысить компетенцию в области биотехнологии.

Выводы

В ходе выполнения работы согласно поставленной цели, получены следующие результаты:

1. Проанализирована литература по теме «Химическая структура пектиновых веществ, способы получения и модификации, свойства и применение».

2. Экспериментально исследован процесс гидролиз-экстракции пектина из свекловичного жома обработкой при следующих условиях: 0,75%-ный раствор щавелевой кислоты, температура 75 °С, гидромодуль 1:5, продолжительность 7 ч. Проведён аналитический расчёт по определению выхода свекловичного пектина на воздушно-сухую массу сырья, он составил 12,30%.

3. Исследованы физико-химические свойства полученного свекловичного пектина в соответствии с ГОСТ 29186-91: СЭ = 51,32%, М.М. = 19,72.

Список использованных источников

1. Аверьянова Е.В. Пектин: методы выделения и свойства: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ для студентов направлений подготовки «Биотехнология», «Продукты питания из растительного сырья», магистрантов направления подготовки «Продукты питания из растительного сырья» / Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьникова. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, БТИ, 2015. – 42 с.
2. ГОСТ 8756.2-70. Продукты пищевые консервированные. Методы определения содержания сухих веществ. – М.: Изд-во стандартов.
3. ГОСТ Р 51806-2001 Пектин. Термины и определения. Изменение N 1 (внесено изготовителем базы данных по тексту ИУС N 3), 2011.
4. Донченко Л.В. Пектин: основные свойства, производство и применение / Л.В. Донченко, Г.Г. Фирсов. – Москва: ДеЛи принт. 2007. – 276 с.
5. Королёв Фарм: контрактное производство и упаковка [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https: //www.korolevpharm.ru /dokumentatsiya/ syrevye-komponenty/pektiny.html (дата обращения: 13.04.2019).