АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН Институт химии им В.И. Никитина

На правах рукописи

Джонмуродов Абдували Саломович

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ НЕТРАДИЦИОННЫХ СЫРЬЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ

02.00.04 -Физическая химия

диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор

Мухидинов З. К.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ5
ГЛАВА І. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР11
1.1. Перспективы развития производства пектинов различного
происхождения11
1.1.1. Способы получения пектинов различного происхождения 11
1.1.2. Гидролиз и экстракция фруктовых и растительных пектинов 14
1.2. Способы очистки и концентрирование водных растворов пектинов . 18
1.2.1. Методы осаждения пектиновых полисахаридов из раствора
гидролизата19
1.2.2. Применение мембраны для очистки и концентрирования водных
растворов пектина21
1.3. Состав, структура и свойства пектиновых полисахаридов
1.3.1. Особенности структуры и свойства пектиновых полисахаридов 27
1.4. Транспортные свойства пектиновых макромолекул
1.4.1. Характеристическая вязкость
1.4.2. Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение
пектиновых макромолекул40
ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 46
2.1. Характеристики исходных веществ
2.1.1. Подготовка исходного сырья
2.2. Методы получения, очистки и анализа пектиновых полисахаридов 47
2.2.1. Традиционный метод выделения и очистки пектиновых полисахаридов
из растительного сырья47
2.2.2. Новый метод гидролиз-экстракции пектиновых полисахаридов (флэш-
метод)
2.2.3. Очистка пектиновых веществ

2.3. Количественные методы анализа пектиновых полисахаридов	
2.3.1. Модифицированный титриметрический метод	
2.3.2. Определение количества свободных и этерифицированных	
карбоксильных групп с помощью ИК-Фурье спектроскопии49	
2.3.3. Определение уроновых кислот с помощью мета-гидроксидифенильного	
метода	
2.3.4. Определение молекулярной массы и молекулярно-массового	
распределения пектина методом эксклюзионной жидкостной	
хроматографией51	
2.3.5. ¹ H и ¹³ C и HSQC ЯМР-спектроскопия	
ГЛАВА III. СТРУКТУРНЫЕ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА	
ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ НОВЫМИ	
МЕТОДАМИ	
3.1. Влияние технологических параметров инновационного метода на	
структуру, физико-химические и гидродинамические свойства пектиновых	
полисахаридов различного происхождения	
3.1.1. Флэш-метод гидролиза пектинов различного происхождения 54	
3.1.2. Физико-химические и гидродинамические свойства ПП различного	
происхождения56	
3.2. Влияние параметров флэш-гидролиза на физико-химические свойства НМ -	_
пектина из плодов тыквы, полученного флэш-методом59	
3.2.1. Влияние параметров флэш-гидролиза на структурные характеристики	
$\Pi\Pi$ из плодов тыквы	
3.2.2. Влияние параметров флэш гидролиза на молекулярную массу и	
молекулярно-массовое распределение ПП тыквы	
3.3. Физико-химические свойства и структурные особенности ПП	
подсолнечника, полученных последовательной экстракцией	

ЛИТЕРАТУРА 105	,)
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ104	
ВЫВОДЫ102	,
3.5.2. Факторы, влияющие на гелеобразование пектиновых полисахаридов9	6
3.5.1. Желирующие свойства ПП	
новыми способами	
3.5. Потребительские свойства пектиновых полисахаридов, полученные	
3.4. Мембранная очистка пектинового гидролизата	1
подсолнечника80	1
3.3.2. Влияние способа экстракции на структурные особенности ПП корзине	ОК
гидродинамические свойства ПП корзинок подсолнечника74	
3.3.1. Влияние способа экстракции на физико-химические и	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

Эффективное использование вторичных ресурсов в народном хозяйстве представляет собой экономию материального сырья, способствует устойчивому развитию страны в условиях глобального кризиса. Одним из перспективных направлений использования вторичных продуктов, перерабатывающих предприятий, является получение биополимеров (полисахаридов и белков), так как, несмотря на рост абсолютной величины образующего сырья, недостаток в функциональных продуктах на их основе, весьма ощутим в пищевой, медицинской, парфюмерной и других отраслях промышленности.

Республика Таджикистан является страной с огромным потенциалом возобновляемых сырьевых ресурсов, из которых можно получить не только пектиновые полисахариды (ПП), но и другие растительные продукты профилактического назначения. Учитывая огромный сырьевой потенциал, а также ежегодно возрастающую потребность населения в функциональных пищевых продуктах, разработка универсальных технологий для получения полисахаридов является крайне актуальной.

В то же время имеется ряд нетрадиционных сырьевых баз для получения ПП, среди которых можно отметить корзинки подсолнечника и плоды тыквы, которые требуют определённый подход при их получении и обращении. Наличие перечисленных сырьевых баз, имеющих в себе готовые низкометилированные (НМ-) пектины, способствуют упрощению технологии получения этого типа пектина, который нашел потенциальный рынок в медицине, фармацевтической и пищевой промышленностях.

Внедрение инновационных технологий, позволяющих производить пектин из вторичных отходов с низкой себестоимостью, является важнейшим направлением развития современной промышленности. В связи с этим

актуальной проблемой представляется постановка исследования в области инновационных методов получения пектина из разных источников с определёнными физико-химическими характеристиками.

В этом плане пектиновые полисахариды или на языке пищевиков «пектин», в отличие от других структурообразователей, проявляют различные свойства в зависимости от способа источника получения, выделения и очистки, от состава и структуры основной цепи, а также от формы и свойств отдельных макромолекул в растворе. ПП самые сложные по структуре биополимеры клеточных стенок растений, поэтому для каждого типа пектина необходим подбор соответствующих условий при изготовлении пищевых или фармацевтических продуктов. Кроме того, некоторое аномальное поведение этих биополимеров, изменение конформации и тенденция макромолекулы ПП к агрегации, отрицательно сказывается на их потребительских свойствах.

Следовательно, знание физико-химических свойств и гидродинамическое поведение этих биополимеров существенно облегчает контроль технологических параметров производства и осуществление важных функциональных свойств этих биополимеров.

Цель и задачи работы.

Целью работы являлось изучение физико-химических, гидродинамических, структурных и функциональных свойств ПП, полученных селективным способом из различных источников сырья Республики Таджикистан.

В соответствии с поставленной целью были решены следующие задачи:

 ✓ исследован процесс гидролиза экстракции ПП из плодов тыквы при высокой температуре и давлении в автоклаве (флэш-способ);

- ✓ исследован процесс гидролиза экстракции ПП из корзинок подсолнечника последовательной обработкой растительного сырья;
- ✓ изучены физико-химические показатели и молекулярные характеристики ПП, полученные из местного растительного сырья;
- ✓ выявлена эффективность диаультрафильтрационной очистки на физикохимические и гидродинамические свойства ПП;
- ✓ исследовано строение полученных фракций пектинов;
- ✓ изучены потребительские свойства полученных пектинов.

Научная новизна работы:

- Исследована применимость новой и эффективной технологии получения пектина при высокой температуре и давлении (флэш способ) за короткий период гидролиза для различного вида сырья.
- ПП были селективно экстрагированы из корзинок подсолнечника различными реагентами, проведён детальный анализ физико-химических и гидродинамических свойств, показано, что эти фракции мономодальные по молекулярно-массовому распределению (ММР) отличаются как по составу, так и по конформации макромолекул.
- Исследованы структурные особенности ПП из корзинок подсолнечника и плодов тыквы с использованием ИК-Фурье спектроскопии, ¹H-, ¹³C- и двумерной gHSQC ЯМР-спектроскопии. Показано, что ПП из данных источников представляют гетерополимер, образованный минимум из 5 сахарных остатков. Во фракциях обнаружено наличие 4 вариантов структуры, где карбоксильные группы окружены различными группами.
- Отличие значений молекулярных масс (M_w) , полученных методом эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ), с использованием многоуглового лазерного светорассеивания (МУЛС) и

вискозиметрического детектора, указывают на тенденцию пектинов к агрегации, что может отрицательно сказываться на потребительских свойствах пектиновых полисахаридов.

<u>Теоретическая и практическая значимость работы.</u>

Путем систематического анализа физико-химических И гидродинамических свойств ПП, полученных новыми способами гидролизнайдена экстракции, взаимосвязь молекулярно-массового распределения гетерогенность макромолекул, ИΧ структуры, ассоциация И формы макромолекул с функциональными свойствами. Использование инновационного метода, флэш-гидролиза, по сравнению с традиционными способами, позволяет проводить гидролиз – экстракцию любого сырья, избегая длительного контактирования с высокой температурой и агрессивной средой, не изменяя при этом технологические параметры процесса, что дает возможность сократить энергоемкие и дорогостоящие процессы в производстве пектина. Предлагаемый способ позволяет получать пектин cоптимальными параметрами ПО молекулярной массе, содержанию основного компонента, что делает возможным его широкое применение в различных областях пищевой и фармацевтической промышленностях.

Применение процесса диаультрафильтрации (ДУФ) в производстве пектина, с применением селективных мембран, также приводит к увеличению молекулярной массы, уменьшению полидисперсности образцов и повышению чистоты конечного продукта, что способствует внедрению при производстве пектина энергосберегающего технологического процесса для получения целевого продукта, отвечающего требуемым качествам и экологической безопасности производства.

Систематический анализ z-среднего молекулярного веса ПП позволило рекомендовать внедрение нового параметра при оценке качества студней -

отношение M_z/M_w , указывающего на степень агрегации молекул, препятствующей формированию студней независимо от природы пектина.

Работа проведена в соответствии с планом НИР Института химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан на тему: «Полимерные композиционные материалы на основе вторичных ресурсов растительных и пищевых продуктов» (ГР 0102ТД926 от 11 февраля 2011 г.) и проекта МНТЦ Т-1420 «Разработка эффективного способа получения пектина низкой себестоимости».

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 5 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 8 тезиса докладов на международных конференциях.

Апробация работы.

Основные результаты работы доложены на международной научно -XII практической конференции Нумановских чтениях «Состояние перспективы развития органической химии в Республике Таджикистан» (г. Душанбе, 2015 г.); международной научно - практической конференции, посвященной 1150-летию персидско - таджикского учёного А. Рази (г. Душанбе, 2015 r.); 15th IUPAC International Symposium MacroMolecular Complexes (Greenville, USA, 2013); 18th Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference (Wrexham, UK, 2015); международной научной конференции «Инновационные технологии комплексной переработки природных богатств Туркменистана» (г. Ашгабат, 2012 г.); Materiály VII mezinárodní vědecko - praktická conference «Vědecký pokrok na přelomu tysyachalety - 2011» (Praha, 2011); 14th International Symposium on Macromolecular Complexes (Helsinki, 2011); Пятой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2010» (г. Москва, 2010 г.).

Объём и структура работы.

Диссертация представляет собой рукопись, изложенную на 124 страницах компьютерного набора, состоит из введения и 3 глав, посвященных обзору литературы, экспериментальной части, результатам исследований и их обсуждению, выводам. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 19 таблицами. Список использованной литературы включает 170 наименований.

ГЛАВА І. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Перспективы развития производства пектинов различного происхождения

В пищевой промышленности, пектин включен в список ФАО/ВОЗ как вещество, в целом, признанным безопасным (GRAS) и используется в качестве желирующего и стабилизирующего агента, загустителя в пищевых продуктах, таких как джемы, йогуртовые напитки, фруктовые молочные напитки и мороженое. Область его использования в фармацевтике и расширяется ежедневно. Благодаря способности пектина к биологическому разложению, биосовместимости, вкусовых и универсальных химических и физических свойств гелеобразование, (например, селективная газопроницаемость и т.д.), он является подходящим полимерным материалом для создания пищевых пленок, предназначенных в качестве активной упаковки пищевых продуктов.

1.1.1. Способы получения пектинов различного происхождения

В мире, в последнее время, все больше возрастает потребность в пектине. Так, по докладу представителя информационного центра производителей гидроколлоидов «IMR International» [1], на мировом рынке наблюдается устойчивый рост потребления пектина в среднем на 3 - 3.5 % в год. Основными потребителями пектина являются рынки пищевой и фармацевтической промышленностей. Производство пектина - это динамически развивающийся бизнес и основной его рынок сосредоточен в странах Южной Америке (Аргентина и Бразилия), в Африке (Южная Африка), в Азии (Китай, Иран), СНГ и др., составляет приблизительно 40–44 тыс. тонн. 70 % производимого пектина приходится на долю пектина из цитрусовых культур и 30 % - на долю яблочных

пектинов. Технология получения пектина является закрытой и специально разрабатывается основными производителями этого продукта - IPPA¹ (Международная Ассоциация производителей пектина) членами которого являются Cargill (Бельгия), СР Kelco (Дания, США), Herbstright&Fox KG и Degussa (Германия), Danisco (США), Obipectin (Швейцария) и Yantai Andre Pectin (Китай).

Все эти фирмы, производят пектин по традиционным технологиям, включающим кислотный гидролиз сырья, высокотемпературную экстракцию, сепарацию, концентрирование в вакуум-выпарном аппарате, осаждение пектина спиртом или солями поливалентных металлов, промывку осадка и сушку. Получаемый таким способом порошок пектина является высококачественным для пищевых целей, но в медицинской практике он не всегда может быть использован из-за присутствия в нем сахаров.

Пектиновые полисахариды способны образовывать супермолекулярные структуры посредством межмолекулярных не ковалентных связей. В последнее время, возрастает значительный интерес к таким системам, благодаря широкому использованию их в качестве реологических модификаторов, начинки для пищевых продуктов, биомедицинских имплантатов и носителей лекарственных веществ.

Сегодня, пектины как лечебно-профилактический продукт (пищевые волокна и антиоксиданты) привлекают внимание производителей пищевых и фармацевтических продуктов. Лечебно-профилактическое действие пектинов зависит не столько от вводимого их количества, сколько от функционального

¹ IPPA представляет собой объединение компаний, которые производят пектин. Ассоциация основана в Швейцарии, и регулируется законодательством Швейцарии. Ассоциация является членом ELC, Федерации европейских производителей пищевых добавок и ферментов, и имеет статус наблюдателя в Кодексе Алиментариус (Codex Alimentarius), международный орган, ответственный за разработку стандартов на пищевые продукты, действующий совместно с Программой ФАО/ВОЗ.

состава ПП [2]. В последние годы, кроме гелеобразующих, сорбционных и стабилизирующих свойств, ОНИ нашли широкое применение фармацевтической промышленности и медицине [3]. ПП - жизненно важные биополимеры для стабилизации обмена веществ, они снижают содержание холестерина в организме, улучшают периферическое кровообращение, а также перистальтику кишечника. Но, самое ценное их свойство заключается в том, что они обладают способностью очищать живые организмы от вредных веществ и [4]. Кроме радиоактивных металлов радиопротекторного гипохолестеринемического действия, пектин оказывает положительное влияние на некоторые показатели иммунитета, проявляет антибактериальные свойства [2] и снижает уровень глюкозы, образующейся после приёма пищи [5-7].

Физико-химические свойства ПП обусловлены сырьем, из которого они образованы в клеточной стенке растений, так как различные фрукты, овощи, лекарственные растения содержат, кроме них, также и другие им присущие компоненты. Из-за многостадийности технологического процесса, зависимости от вида растительных источников и использование разных химических реагентов, традиционные методы получения ПП не удовлетворяют потребности в высококачественных продуктах. Для выделения пектина можно способы: [8],физические [9,10],применять различные химические ферментативные [11-13] и другие [14-16].

Альбедо из корок цитрусовых, яблочных выжимок, свекловичного жома и остатки корзинок подсолнечника (КрП) являются основными источниками для производства пектина. Кроме того, сахарная свекла и КрП являются потенциальными источниками пектина. Тем не менее, в настоящее время их производство не является коммерчески целесообразным. То же самое можно сказать и о другом интересным и перспективным источнике пектина, а именно о плодах тыквы [11,12-17]. Богатые природные ресурсы и сравнительно низкая

стоимость сырья создают предпосылки развития технологий для производства тыквенного пектина (ТкП). Исследования [18] показывают, что пектин из кожуры тыквы активирует рост некоторых бактерий молочной кислоты, а это тормозит развитию кишечной палочки (Escherichia coli) и бактерии клостридии перфрингенс (Clostridium perfringens). Полученный пектин из мякоти тыквы содержит рамногалактуронан RG I, который имеет глюкозидно связывающую способность, по сравнению с другими гидроколлоидами [19,20]. Пектин тыквы образует гель при концентрации намного ниже, чем коммерческие цитрусовые пектины [12]. В зависимости от способа экстракции пектина из плодов тыквы, его текучесть и химическая структура была совершенно другой. Когда пектин тыквы был выделен с помощью обработки нескольких штаммов Bacillus Polymyxa, выход был в два раза больше, чем с минеральной кислотой [20]. Выход значительно использовании пектина ТЫКВЫ повышен при микроволнового нагрева без потери качества пектина [17]. На сегодняшний день, к сожалению, состав и свойства полисахаридов из этого ценного сырья мало изучены.

1.1.2. Гидролиз и экстракция фруктовых и растительных пектинов

В промышленном масштабе, пектины, как правило, экстрагируют с использованием горячей воды, подкисленной сильной минеральной кислотой (так называемой — кислотной экстракцией) в условиях низкой рН (1-3), при температуре $60-100^{0}$ С и продолжительности 30-360 мин.

Гидролиз может быть также проведен с помощью ферментов [21,22], хотя этот способ дороже, чем химические методы [23]. Другие существующие гидролитические методы в настоящее время, не имеют промышленного значения. Выделение пектина может быть достигнуто также с помощью хелатных агентов, таких как этилен диаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) и гексаметафосфат натрия (ГМФН) [24-26].

Кинетика гидролиза с минеральными кислотами была подробно обсуждена в работах [27-29] и показана необратимость гидролитической реакции первого порядка по протопектину. В работе [29] проведено исследование по кислотному гидролизу протопектина КрП, используя системы последовательной реакции первого порядка. Ha основании компьютерного анализа рассчитаны численные значения k_1 и k_2 для распада связей с остатками галактуроновой кислоты (ГК) и нейтральных сахаров (НС) в протопектине (k_1) и в первом продукте распада протопектина — микрогеле $(M\Gamma)$ (k₂). Дана оценка вклада каталитической активности противоиона. Показано, что наряду с кислотой, в ускорении реакции гидролиза протопектина, определенный вклад могут внести и анионы низкомолекулярной соли. Благодаря каталитической активности противоиона открывается дополнительная возможность В регулировании процесса гидролиза формировании структурных параметров компонентов ПП.

Технология получения пектиновых биополимеров в настоящий момент основана на кислотном гидролизе растительного сырья с последующим выделением пектина из раствора гидролизата путем концентрирования на вакуум-выпарных установках и осаждением ИЗ концентрата большим количеством этилового спирта. Производственный процесс протекает при повышенных температурах (80-100° С) в кислой среде при рН 1.2-2.0 с продолжительностью времени гидролиза от 1 до 3 часов и общим циклом процесса до 12 и более часов (рис 1.1) [30,31]. При этих условиях происходит деградация пектиновых макромолекул, что приводит к потере основного свойства пектина-гелеобразования. Одним из сложных и дорогостоящих процессов в производстве пектина является концентрирование и очистка пектина из раствора гидролизата.

В связи с этим разработка методов гидролиза-экстракции ПП из местных сырьевых ресурсов, способов их очистки и концентрирования из раствора гидролизата с применением энергосберегающих технологий, исключающих применение химических реагентов и не нарушающих нативную структуру и свойства молекул пектина является актуальной.

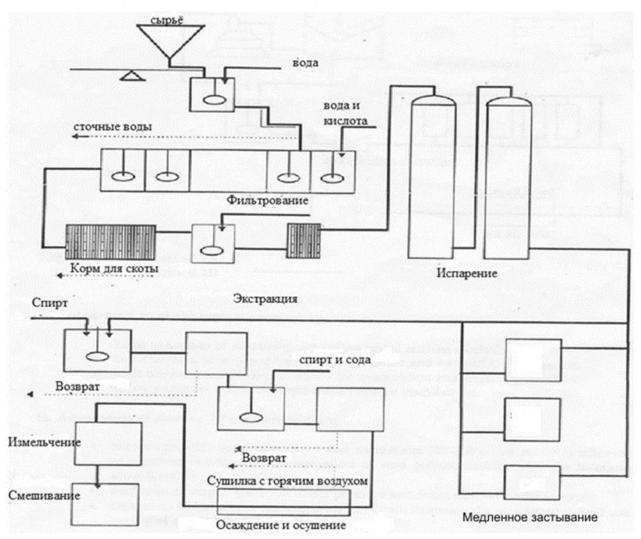


Рисунок 1.1. Традиционная технологическая линия производства пектина.

Учитывая вышесказанное, в данной работе приводится описание новых методов гидролиз-экстракции пектинов из различных источников [32-34], разработанные в лаборатории Химии высокомолекулярных соединений Института химии Академии наук Республики Таджикистан. Разработаны

методы очистки и концентрирования пектиновых растворов с применением мембранной технологии [33], и инновационный подход, связанный с переработкой сырья, позволяющий улучшить качество и снизить себестоимость целевого продукта [34].

Для интенсификации производства и рационального использования реагентов авторами [9,10] применены также физические методы гидролиз – экстракции пектинов.

[9], Известен способ производства пектина предусматривающий смешивание пектинсодержащего сырья с водой, обработку смеси в роторнокавитационном экстракторе, разделение фаз и выделение пектина из жидкой фазы. Способ предусматривает обработку смеси в ступенчатом роторнокавитационном экстракторе при постоянных параметрах гидромодуля и индекса кавитации, в зависимости от которых изменятся выход пектиновых веществ (ПВ) и их концентрация в жидкой фазе. Авторами [9] выявлено, что максимальный выход пектина из сырья, приблизительно соответствующий равновесной концентрации в жидкой и твердой фазах, достигается при гидромодуле от 1:7 до 1:11 для различных видов сырья. Это обуславливает низкую концентрацию пектина в жидкой фазе, а также сложность аппаратуры и высокие энергозатраты на его выделение любыми известными методами.

Авторами [10] разработан способ получения пектина за короткий промежуток времени, заключающийся в том, что смесь пектинсодержащего растительного материала с кислым раствором в соотношении 1:25 (г/мл) подвергается гидролизу в закрытом сосуде под действием микроволнового излучения (частотой 2450 МГц и энергией 630 Вт) при температуре 80-125⁰ С в течение 2-3 мин и последующим охлаждением, фильтрованием растительного сырья для отделения пектинового экстракта 70 % изопропиловым спиртом (в соотношении 1:5) и дальнейшей 3-кратной промывкой 70 % тем же спиртом и 3-

кратным 95 % спиртом, отжимом и высушиванием. Недостатком этого способа является то, что под воздействием микроволнового (СВЧ) излучения могут деградировать компоненты клеточной стенки растений с образованием облученных и токсических веществ, что приводит к ухудшению качества ПП, а использование большого количества спирта отрицательно влияет на экологию производства и повышает стоимость продукта.

1.2. Способы очистки и концентрирование водных растворов пектинов

Разбавленные растворы сильных минеральных кислот при вышеприведённых условиях действительно способны высвобождать из клеточной стенки растений (КСР) фракции ПП, растворимые не только водой, буфером, и хелатирующими агентами, но также и пектины, которые устойчивы к этим называют «протопектины», связанные с целлюлозой агентам. гемицеллюлозой посредством арабинановыми и галактановыми боковыми цепями [23,29,35,36]. Кислотная солюбилизация последнего происходит через расщепление гликозидных связей, в первую очередь, образованных боковыми связями. В кислой среде (pH <2), гликозидная связь между двумя нейтральными остатками и боковыми связями из них действительно более чувствительна к кислотам, чем гликозидные связи между остатками рамнозы и галактуроновой кислотой (псевдо-альдобиуроновые или альдобиуроновые связи), в то же время связь между двумя остатками галактуроновой кислоты (ГК) является наиболее стабильной [37-39]. Следовательно, кислотный гидролиз, как правило, обогащает содержание ГК в экстрагированных ПП. При этом сокращает боковые участки цепи рамногалактуронана и впоследствии существенно ухудшает молекулярный вес, приводя к возрастанию характеристической вязкости и проявлению аномалии в поведении ПП [40]. В общем, извлеченные фракции ПП клеточной стенки растений содержат как пектины, так и свободные нейтральные компоненты, которые могут содержать мономерные сахара,

олигосахариды (ОС) и ПП с высоким молекулярным весом-микрогеля (МГ) [31].

1.2.1. Методы осаждения пектиновых полисахаридов из раствора гидролизата

В производстве коммерческих пектинов, яблочных (ЯП) или цитрусовых (ЦП), растворы гидролизата очищают осаждением ПП поливалентными металлами с последующей обработкой водно-спиртовыми растворами кислот или осаждением спиртом, что может предусматривать дополнительное спиртовое промывание для удаления солей, свободных сахаров и других спирто-растворимых соединений и преобразование пектина в форму свободной кислоты [41-48].

В лабораторном масштабе, спиртовое осаждение или диализ часто используется для очистки пектиновых гидролизатов полученных из КСР. Как предполагают авторы [39,48-50], ЭТИ процессы ΜΟΓΥΤ удалять низкомолекулярные компоненты сахаров, в частности, моносахариды и дисахариды, благодаря их высокой растворимости в спирте или способности легко проходить через поры мембраны при диализе, но не позволяют очистить пектин от больших осколков нейтральных олиго- и полисахаридов. Полученные таким образом образцы ПП, содержат заметное количество свободных нейтральных полисахаридов с высоким молекулярным весом, которые отличаются от нейтральных полисахаридов ковалентно связанными в боковых цепях пектинов [43-46]. Кроме того, нейтральные сахара, такие как глюкоза, манноза и фруктоза, которые не включены в пектиновые цепи, были обнаружены в спиртовых растворах после осаждения гидролизата яблочных выжимок [35,36,43-46]. Эти сахара, возможно, являются продуктами гидролиза гемицеллюлозы [46,48]. До сих пор в литературе мало встречаются сравнительные исследования более чем двумя различными методами очистки пектина (например: спиртовое осаждение, диализ, диаультрафильтрация и осаждение солями поливалентных металлов).

[39],Авторы В сравнительном исследовании процесса очистки коммерческого ЯП способом осаждения ионами двухвалентной меди и диализом (использовали мембрану с пропускающей способностью 12 тысяч Дальтон (КД)) на основные характеристики ПП (содержание ГК и нейтральных сахаров, степень этерификации карбоксильных групп (СЭ) и молекулярных параметров (молекулярная масса и характеристическая вязкость) показали преимущество первого метода. Для очистки пектина от неуронидных составляющих фракций ПП были выделены из раствора осаждением ионами Cu^{2+} , затем комплекс с ионами Cu^{2+} был разрушен солянокислым спиртом и ЭДТК. Загрязняющие ПП вещества были удалены более эффективно осаждением, чем диализом. Такая обработка не влияла на степень этерификации пектинов, в то время как значительно расщепляла боковые цепи из нейтральных сахаров. ПП обработанные первым способом имели более низкие молекулярные массы, но у них были высокие значения характеристической вязкости, что говорит о более линейной структуре полученных пектинов по сравнению с пектинами, полученных с использованием ЭДТК.

Сравнительное исследование процесса гидролиз-экстракции пектина из КСР фруктов желтой маракуйи, с использованием различных гидролизирущих агентов (лимонная, азотная и серная кислоты), показало, что тип кислоты сильно влияет на макромолекулярные и желирующие свойства отдельных пектинов [37,38,47]. Гидролиз-экстракция с лимонной кислотой является наименее мягким условием, где пектин менее подвергается деполимеризации и деэтерификации, следовательно, приводит к получению пектина с лучшими гелеобразующими свойствами. Тем не менее, возможные различия в качественных характеристиках, извлеченных пектинов, при использовании

различных способов очистки еще мало привлекли внимание учёных в этой области.

1.2.2. Применение мембраны для очистки и концентрирования водных растворов пектина

Основная часть производимого пектина используется в пищевой промышленности как гелеобразующий агент, а также как стабилизатор и эмульгатор [30,41,42,51-53]. Важнейшей характеристикой пектина является его способность к гелеобразованию и комплексообразованию, что обусловило широкое применение и в медицине [2,3,54,55]. При этом пектин должен пройти определенный процесс очистки. Для очистки пектинового гидролизата, как было отмечено выше, применяется способ осаждения гиролизата спиртом, промывка его от низкомолекулярных веществ или диализ с использованием ультрафильтрационных мембран [39-50,56,57]. Ультрафильтрация (УФ) в производстве пектина применяется в целях удаления полифенольных соединений, взвешенных твёрдых веществ, а также олигосахаридов и других низкомолекулярных соединений [33,58-62].

осуществления мембранного Для разделения смесей необходимо подобрать подходящую мембрану. В реальном процессе разделения производительность мембраны, или, правильнее сказать, производительность всей системы, со временем может очень сильно измениться (обычно наблюдается падение потока во времени). Роль этого явления в значительной мере зависит от типа решаемой задачи разделения. Уменьшение потока оказывается, особенно, драматическим в процессах микрофильтрации и ультрафильтрации, где достаточно часто реализуется ситуация, когда в процессе разделения смесей поток составляет менее 5 % от потока чистой воды. Падение быть потока может вызвано несколькими причинами концентрационной поляризацией, адсорбцией, образованием слоя геля и

забиванием пор [56,57,63]. Все эти факторы приносят дополнительное сопротивление транспорту через мембрану на входе в систему. Величина этих эффектов сильно зависит от типа мембранного процесса и свойств раствора, подающих на мембрану. Особенно характерно это явление для растворов белков и высокомолекулярных веществ. В случае пористых мембран некоторые компоненты могут проникать внутрь мембраны и блокировать поры [63]. Это дополнительное сопротивление называют сопротивлением блокированных пор. Наконец, к возникновению сопротивления могут приводить адсорбционные явления. Адсорбция может происходить как на поверхности мембраны, так и на Падение потока отрицательно сказывается стенках техникоэкономических показателях каждой мембранной операции, поэтому необходимо принимать определенные меры для устранения причин, связанных с этим явлением.

Процессы мембранного разделения имеют большое значение в пищевой промышленности, из-за их способности осуществляться в обычных условиях, и не сопровождаться фазовыми изменениями или воздействием химических агентов. В работе [57] приводятся результаты использования мембранных процессов для депектинизации при очистке фруктовых соков, сохраняющие естественный свежий вкус. Изучен, процесс оптимизации и очистки сока яблок мембранного при использовании ферментсодержащего реактора В лабораторных условиях и на полупромышленном оборудовании. В качестве характеристики мембранной системы исследована проникающая способность вещества и степень депектенизации. Была проведена оценка воздействия различных параметров (трансмембранное давление, скорость потока, подача мембраны, смеси И т.д.) на загрязнение механизм загрязнения интерпретировался в терминах полного блокирования пор или фильтрационной пробки. Поток растворенного вещества улучшается с увеличением процентного содержания фермента в подаваемой смеси.

Запатентован способ очистки пектинсодержащего раствора ультрафильтрацией через мембраны, пропускающие вещества с молекулярной массой 6-20 КД [59]. Предварительно отфильтрованный пектиновый гидролизат рН NH₄OH до 3.5, которого устанавливает ультрафильтруют коммерческую мембрану (IL-100 Ayahi KaseiCo) при 60° С в течение 3 часов под давлением 1 кг/см². При этом получают пектиновый препарат с градусом студнеобразования 1900 SAG.

В работе [60] предложен способ осветления плодово-ягодного соков (яблочного, цитрусового, виноградного, морковного, земляничного) выделение пектина с применением мембран. Этот процесс заключается в том, что прессованием сок подвергают ультрацентрифугированию через мембрану, жидкой фазе образом, чтобы в осветленной остались сахара, ароматические вещества и витамины, а на мембране пектин. Пектин промывают водой, вновь подвергают УФ, получая вторичный осветленный сок и концентрат пектина, который подвергается сушке. Поверхность мембран при УФ составляет соответственно 150 и 50 м². Производительность процесса при этом 20000 л/ч. Предложенный метод может быть использован для осветления соков овощей и фруктов, содержащих пектин.

Фруктовые или овощные соки, например, из яблок, клубники и свеклы в работе [60], обрабатывали более двух циклов ультрафильтрации, с получением очищенного сока и чистого пектина. Например, сырой яблочный сок нагревают до 57-59⁰ С, рН поддерживают в пределах 3.5 и 4 и подвергают УФ через трубчатую мембрану, задерживающую вещества с М_w 20 КД, с выходом очищенного сока и сырого пектинового концентрата. Концентрат разбавляют и вновь ультрафильтруют с получением более чистого пектина и вторичного сока.

Авторами [61] установлено, что очистка и концентрирование пектиновых экстрактов из яблочного сырья, мандариновых выжимок и свекловичного жома более эффективны на трубчатых типа AP-6 разделительных модулях. В образующемся при этом пектиновом концентрате содержится 3.5-4.7 % пектина, чистота его 92-95 %. Кроме того, отсутствуют фракции низкомолекулярного (8-15 КД) пектина, что представляет значительный практический интерес.

Исследована [62] возможность концентрирования ΠВ диа-И ультрафильтрацией в солянокислых экстрактах свекловичного пектина, полученных методом кавитационно-кислотной экстракции из свежего и высушенного свекловичного жома. Перед ультрафильтрацией экстракты обрабатывали на центрифуге и фильтровали через бельтинг. Отфильтрованные экстракты подвергали концентрированию на половолоконных мембранах ВПУ-15 с фильтрующей поверхностью мембраны 6 м². Установлено, что для концентрирования и очистки экстрактов свекловичного пектина оптимальная температура 40-45⁰ С, давление 0.2 МПа. Как отмечают авторы, простым концентрированием удается очистить пектины лишь частично. В концентрате остаются минеральные вещества, сахара, соли и часть красящих веществ. В то же время диаультрафильтрацией можно практически полностью отделить высокомолекулярные фракции от низкомолекулярных.

В работе [63] была исследована также микрофильтрации раствора цитрусового и яблочного пектинов при скорости поперечного потока до 1.64 м/с, с использованием трубчатой макропористой титановой мембраны диаметром 1.6 см с иммобилизованной пектиназой. В качестве контроля проводилось также сравнительное изучение потока с использованием той же самой мембраны без иммобилизованной пектиназы. Показано, что величина потока была значительно выше через мембрану с иммобилизованной

пектиназой, чем через контроль при значениях поперечной скорости – 0.8 и 1.2 м/с.

Анализ полученных результатов потока с использованием модели устойчивости указывает на то, что промежуточная область скорости потока увеличивается в присутствии иммобилизованной пектиназы. Однако, явление, связанное с поляризацией концентрации под действием этого поперечного потока, была уменьшена достаточно для того, чтобы создать условия к увеличению потока, по сравнению с контрольной мембраной. Фермент был активен в снижении молекулярной массы пектина во всех экспериментах.

В работе [63] непрозрачный сок, полученный прессованием яблока обрабатывали различным количеством коммерческой пектиназы, Pectinex 3XL (0-400 ppm), в течение 2 часов при 55° С в пакетном реакторе. Полученный продукт перекачивали через УФ - мембрану покрытой оксидом циркония (пропускная способность 15 КД). Показано, что поток растворенного вещества был пропорционален текущему содержанию пектина в подаваемом растворе к модулю ультрафильтрации.

Главным звеном в бесспиртовой технологии производства пектина является применение селективно проницаемых мембран в процессе концентрирования и очистки пектиновых экстрактов. Эффективность применения мембран в производстве пектина представлена в работах [64,65].

При проведении концентрирования пектиновых экстрактов на поверхности мембраны происходит образование слоя гелевых отложений, что влечёт за собой уменьшение производительности мембраны. Для восстановления пропускающей способности мембраны необходимо проводить её регенерацию [66].

Регенерация мембран является неотъемлемым элементом при осуществлении любого мембранного процесса. Если говорить об

ультрафильтрации с применением полимерных мембран независимо от их конфигурации, будь то пластинчатые, трубчатые, половолоконные или другие, то регенерация в данном случае связана, прежде всего, с восстановлением производительности мембран в процессе мембранного цикла концентрирования или после него [66].

В работе [66] использовались 6 коммерческих ферментных препаратов различного действия одинаковой степени очистки, для выяснения характера загрязнения мембран: ВИС – комплекс пектолитических ферментов; БЦ, ЦК, ЦВ – карбогидраза (целлюлаза, геммицелюлаза, β -глюкозидаза); ПР – протеаза, амилаза; ФЛ – лиаза.

Полученные данные свидетельствуют о том, что основной вклад в формирование слоя геля вносят ПП, а также целлюлоза. Для регенерации мембран целесообразно применять моющую композицию, содержащую ферментные препараты пектолитического и карбогидразного (БЦ, ЦК, ЦВ) действий.

Известно, что высокие значения вязкости при концентрировании растворов имеют отрицательный эффект на массообмен в ультрафильтрации. Для повышения эффективности массообмена в последние годы принимались поливолоконные мембраны с поперечным (тангенсальным) потоком раствора ретентата [33,66-69].

Эксперименты по мембраной фильтрации яблочного сока на УФ трубчатой мембраны с модулем из полисульфона, где концентрация пектина в яблочном соке варьировала от 0.01 мас % до 0.05 мас %, а рабочее трансмембранное давление колебалось от 20 до 30 Рsia, приводятся в работе [69]. В данном эксперименте было исследовано влияние скорости расхода подачи раствора и время разворота потока на производительность мембраны по пермеату.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение обратного потока в процессе УФ значительно повышала скорость потока и это может быть использовано в качестве эффективного средства для смягчения вредных эффектов мембранного загрязнения и концентрационной поляризации.

1.3. Состав, структура и свойства пектиновых полисахаридов

1.3.1. Особенности структуры и свойства пектиновых полисахаридов

Пектиновые полисахариды являются сложными структуре ПО биополимерами, входящими в состав клеточной ткани растений. Они составляют гидрофильную часть полисахаридного матрикса (ПМ) клеточной стенки растений, которая выполняет жизненно важные функции. В клеточной стенке растений ПП присутствуют в виде линейного гомогалактуронана (НG), рамногалактуронана I (RG I), рамногалактуронана II (RG II), апиогалактуронана (АG) и ксилогалактуронана (КГ), имеющих разветвленное строение [68]. Карбоксильные группы ГК находятся в этерифицированных и свободных состояниях. Кроме того, в клеточной стенке многих растений встречаются неразветвленные, неэтерифицированные блоки $\Pi\Pi$. которые образуют волокнистые пучки (агрегаты) посредством ионов кальция [69] и при экстракции выделяются из раствора гидролизата в виде микрогеля.

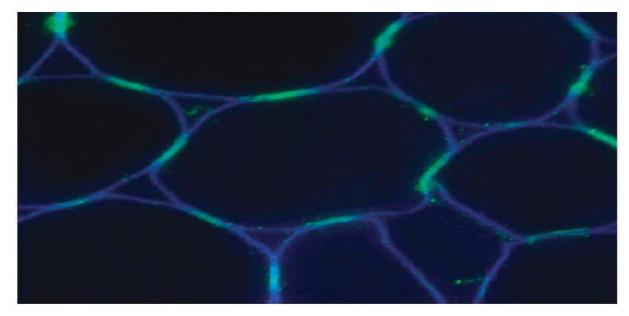
Пектиновые полисахариды с высоким содержанием ГК становятся незаменимыми гелеобразователями И эмульгаторами В пищевой промышленности при изготовлении различных кондитерских изделий, а также желейных детских и диетических продуктов. В то же время, ПП с RG преобладанием разветвленных находят широкое применение фармацевтической промышленности, как основа для создания носителей лекарственных веществ [2,3,5,54,70] и других продуктов профилактического назначения [2]. В последние годы проявляется большой интерес к биологически активным природным углеводам растений, обладающих широким спектром физиологической и иммунной активностей [2,5,71-74].

Пектиновые вещества, полученные из различных растительных источников, отличаются по структуре, молекулярной массе и молекулярномассовому распределению [75].

Структурная сложность ПМ заимствована биоразнообразием видов растений и климатических условий их роста. Разнообразие в структуре полисахаридов клеточной стенки берёт свое начало еще в период эволюции при биосинтезе и продолжает меняться в зависимости от требований окружающей среды: сопротивляясь силе тяжести, иногда создаёт гибкости, проницаемость по отношению к воде и минералам и обеспечивает растениям защиту от действий патогенных атак [76-78]. Идеальная гетерогенность ПМ замаскирована в природном начале, так как они подвергаются большому структурному изменению после гидролиза, тем более из различных видов клеток. Это разнообразие способствовало открытию ряда современных инструментальных методов познания компонентов клеток, которые включают ферментативный гидролиз и масс спектроскопию [79-86], а также новых методов: специфический метод колонирования антител [81], атомно-силовая микроскопия (АСМ) [69,76,86,87], Раман спектроскопия [77] и метод оценки целлюлярной органеллы в реальном времени [78].

Целлюлоза является главным компонентом большинства клеточных стенок растений, она формирует микрофибриллы и создаёт прочность стенкам клеток. Эта макромолекула состоит из неразветвленных, незамещенных цепей (1,4)-β-D-глюкана, которые способны образовывать не ковалентные микрофибриллярные каркасы через множество меж- и внутримолекулярных водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Основной костяк химической структуры целлюлозы в клеточных стенках различных растений,

тканей и органов по существу идентичны, но по длине макромолекулярной цепи у целлюлозы существует немало неоднородности, а его степень кристалличности также может меняться.



1.2. Рисунок Неоднородность В композициях клеточных стенок. Иммунофлуоресценционная микроскопия И антитела различной специфичностью для арабинановых полисахаридов и их подструктур были использованы для изучения неоднородности арабинанов в стволовых клетках Arabidopsis. В пробковой паренхиме, эпитоп LM16 ограниченные в регионах, придерживались клеточных стенок, отсутствовал регион клеточной стенки, окружающих межклеточные воздушные пространства [81].

В отличие от целлюлозы другие (не целлюлозные) полисахариды КСР составляют гелеобразную матрицу, имеют более сложные структуры и проявляют значительную неоднородность, как в тканях, так и на молекулярном уровне. Во всем царстве растений, множество полисахаридов ответственны за формирование матрицы клеточной стенки (рис. 1.2), но обнаруженные различия имеющиеся, в настоящее время, в химии полисахаридов опровергают разнообразие эволюционных историй, которые сводятся к формированию

химически гетерогенного, но функционально компетентного, гелеобразно-полисахаридного матрикса (рис. 1.3) [83].

Другими словами, необходимые физико-химические свойства полисахаридов клеточной стенки растений могут проявляться с помощью ряда химических стратегий их получения. Клеточная стенка в эндосперме бобовых часто содержит относительно большое число маннанов, галактоманнанов и галактоглюкоманнанов [84].

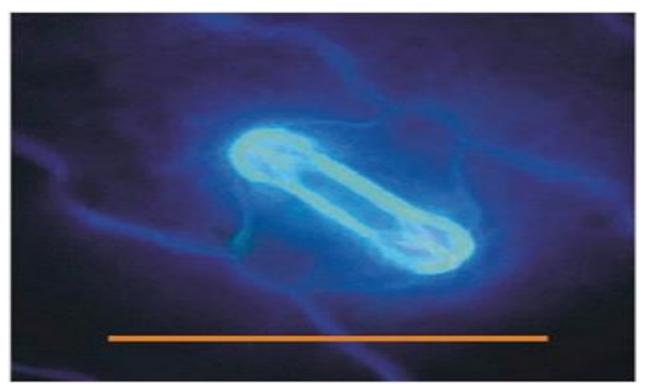


Рисунок 1.3. УФ флуоресценция клеточной стенки, где продемонстрирована связь с соседними клетками в кукурузе. Данные показали, что клетки имели защитные оболочки из различного количества фенольных эфиров пектина, в отличие от эпидермальных клеток [82].

Основной остов цепи макромолекулы целлюлозы, ксилиглюкана, (1,3; 1,4)- β -глюкана, гетероксилана и гетероманнана построены из (1,4)- β -связанного моносахарида, в то время как основную цепь ПП составляют (1,4)- α -связанные остатки галактуроноанов (рис.1.4).

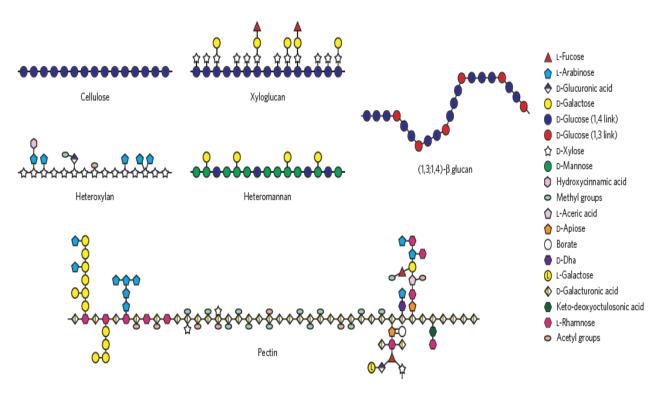


Рисунок 1.4. Структурная неоднородность полисахаридов клеточной стенки растений.

Агрегация цепи в целлюлозных полисахаридах мало встречается, а у KC. полисахаридов других не целлюлозных основном из-за пространственного затруднения, вследствие наличия y них олигосахаридов, моносахаридов или ацетильных групп происходит агрегация макромолекул. У (1,3; 1,4)-β-глюканов нерегулярная структура полисахарида препятствует агрегации основной цепи [85,86].

Пектиновые полисахариды могут быть последовательно и избирательно выделены из клеточной стенки различными реагентами [81-85]. Использование хелатных агентов, таких как циклогегсандиаминтетра уксусной кислоты (ЦДТУК), как правило, выделяют ПП из области средней пластинки, где они на данном участке клеточной стенки преимущественно сшиты ионами кальция. Это аналогия модели «яичных коробок», созданной для гелей НМ-пектинов и

алгинатов на основе кооперативного связывания ионов кальция с гомогалактуронанами [81,87-91].

Характер зон поперечных связей достаточно хорошо изучен, в то время как, природа взаимодействия дальнего порядка в гелях остается мало изученной. На рис. 1.5 показаны схематические модели связывания для взаимодействия дальнего порядка.

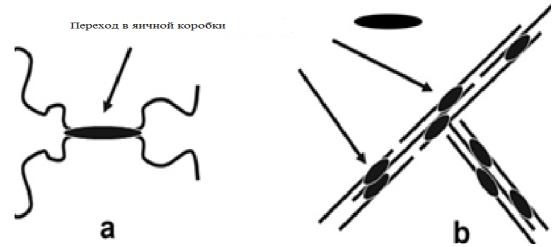


Рисунок 1.5. Альтернативные структурные модели для взаимодействия дальнего порядка, в пектиновых гелях полученные в среде с кислотой или ионами кальция.

Структуры, представленные на рис. 1.5 (а) обычно приведены в обзорах и в главах книг, посвященных гелеобразованию полисахаридов. Это псевдо эластичные сетки, вытянутые, а не узкие точки сшивки, относят к энтропийным гелям. В качестве альтернативы (рис. 1.5 (b)) приводятся энтальпийные гели, в которых поперечные связи действуют как липкие смазанные участки (эллипсоидные формы) связывания молекул внутри вытянутой разветвленной волокнистой структуры [89].

Атомно-силовая микроскопия может быть использована для изображения отдельных молекул пектина и изучения их агрегации [69, 76, 86, 87]. На рис. 1.6 (а) показано типичное изображение отдельной молекулы пектина: образ

молекулы пектина сахарной свеклы, полученного после щелочной обработки. Топографическое (детальная визуализация) изображение молекулы пектина было проявлено в водной среде и среде $MgCl_2$ путем нанесения их на подложку из слюды.

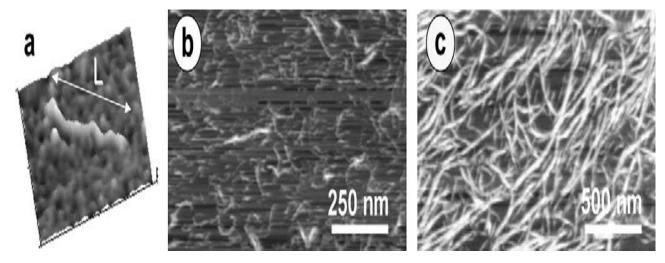


Рисунок 1.6. Изображение АСМ пектина сахарной свеклы, гель вызван подкислением или деэтерификацией пектина. (а) Топографическая картина отдельной молекулы пектина снятого в присутствии MgCl₂. Средняя длина (персистентная) для индивидуальной молекулы пектина L=70 нм. (b) Топография молекулы пектина и волокнистых гель-прекурсоров проявленного в бутаноле. (c) Топография фрагмента кислотно-индуцированного геля проявленного в бутаноле [69].

Средняя длина популяции макромолекул (персистентная длина макромолекулы) найденная, с помощью ACM, L=70 нм и высотой 0.6 нм. Подкисление разбавленного раствора пектина приводит к образованию волокнистых гель-прекурсоров, которые ΜΟΓΥΤ быть нанесены свежепрокаленную слюду, затем изображение отдельных фрагментов молекул под бутанолом были сняты на ACM (рис. 1.6 (b)). При более высоких концентрациях пектина тоже образуются гели, которые слишком слабы, чтобы получить непосредственно изображение на АСМ. Когда просматриваются снимки под микроскопом, эти структуры видны в виде разветвленных волокнистых сетей (рис. 1.6).

Подобные структуры видны на фотографиях гелей индуцированных ионами кальция. На рис. 1.7 (а) показаны фрагменты геля с кальцием пектина, полученного из сахарной свеклы после щелочной обработки.

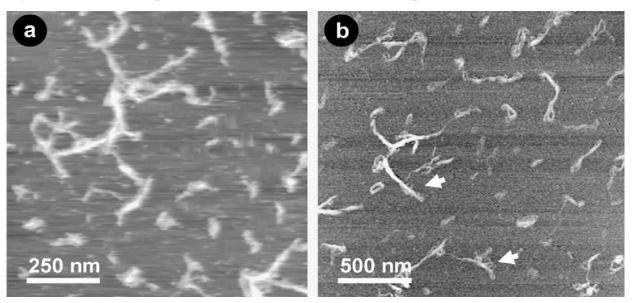


Рисунок 1.7. АСМ-изображение из фрагментов кальций-индуцированной геля пектина. Гелеобразование вызвано добавлением CaCl₂. (а) Топографическое изображение фрагментов кальций-индуцированной геля из щелочнообработанного пектина сахарной свеклы, полученного на слюде под бутанолом. (b) АСМ-изображение снятое с использованием режима сборки (tapping mode) из фрагментов кальций-индуцированной ЦДТУК экстракты пектина зеленого помидора отображённого на слюде под бутанолом [69].

Структуры видны как вытянутые разветвленные волокна похожие на те, которые были получены для кислотно-индуцированного геля. Таким образом, полученные в данной работе молекулы ПП щелочной обработкой пектина сахарной свеклы, поддерживают структуру волокнистой модели пектинового геля. Учитывая, что ПП являются заряженными молекулами, это не

удивительно, что они скручиваются в волокна, чтобы максимально нейтрализовать заряд при ее формировании. Поэтому, интересно рассмотреть структуры, образованные высокометилированными (ВМ-) пектинами, которые не содержат чередующихся блоков НG, но в то же время они способны кооперативно связывать ионы кальция.

ЦДТУК экстракты зеленых помидоров являются ВМ-пектинами, но они образуют гели с ионами кальция [92], предполагается, что они содержат отдельные блоки НG. На рис. 1.7 (b) показано АСМ - изображение фрагментов кальций-индуцированного геля из пектина зелёных помидоров.

Стрелки на фотографии указывают на частичное присоединение пектиновых цепей в вновь формирующиеся волокнистые структуры. Фрагменты видны в виде разветвленных волокнистых структур, а не как дискретные зоны, собой неупорядоченными связанные между пектиновыми цепями. Использование режима сборки (tapping mode) под бутанолом позволяет детально изобразить фрагменты молекул. Белыми стрелками показаны фрагменты пектиновых цепей, оторванных OT поверхности волокон, предполагая, что эти цепи пока еще не полностью впитывались в волокна. Эти фотографии показывают, что даже ограниченные по размеру пектиновые цепи, способны к сшиванию, они действуют как пучки, склеиваясь вместе в волокнах: формирование волокон не зависит от непрерывного распределения заряда вдоль полимерной цепи [69,70,76].

Состав ПП зависит от исходного сырья, условий их переработки и факторов среды роста растений [93-95]. Основной полисахарид представляет собой полимер α -1-4 **D**-галактуроновой кислоты co связью между ангидрогалактуроновыми остатками cразличным количеством метил этерифицированных карбоксильных групп [95]. Согласно авторам [96], введение α (1,2)-Rha в основную цепь происходит через 20 мономеров ГК.

Обычно, пектин содержит 65 % ГК и может находиться в трех формах: линейный НС и разветвленных RG I и RG II [96]. Соотношение рамнозы ГК может варьироваться от 25 до 200 единиц. В случае, цитрусовых это соотношение соответствует 40, но только 15 % рамнозы было вовлечено в линейную форму, и около 85 % находилось в разветвленной. В яблочном пектине 22 % рамнозы находилось в линейной форме, и 78 % были включены в разветвленную фракцию. Волосатая фракция ПП (RG) имеет две различные структуры. Первая (RG I) содержит несколько димеров -GA- Rha- в основной цепи, где нейтральные олигосахариды, состоящие из арабинозы и галактозы, присоединены к боковым цепям и вторая (RG II), где боковые нейтральные и другие моносахариды непосредственно входят в главную цепь, содержащей около семи остатков ГК [97].

Таким образом, качество пектина при кислотном гидролизе связано со многими факторами, в том числе от типа фруктов [27,28,76,98], отношения сырья и экстрагента, разнообразием и процессами получения [99], очисткой и сушкой [33,44], типов и концентрации кислоты [100], а время и температура реакции играют фундаментальную роль в получении и деградации пектина [27].

1.4. Транспортные свойства пектиновых макромолекул

1.4.1. Характеристическая вязкость

Гидродинамическое поведение ПП определяется химическим строением и молекулярной массой. Наиболее распространенным и простым методом определения гидродинамических свойств биополимеров является определение вязкости, в котором определяются характеристическая вязкость и коэффициент диффузии. Этим методом можно косвенно определить молекулярный вес (M_w) , гидродинамический радиус (Rh), число Шима, $(v_{(a/b)})$, поступательное фрикционное соотношение (параметр Перрена) (f/f_o) , параметр Шерага-

Манделькерна (β) и параметры Флори (φ и P_0). Все гидродинамические параметры зависят от температуры. Обычно эти параметры измеряются при температуре 25^0 C, что ограничивает их применение для других температур, принимаемые в практике.

В связи с композиционной неоднородностью ПП [45,73,87-89], изучение конформации гидродинамического поведения или изолированной макромолекулы пектина усложняется. В этой связи, данные по этим вопросам в литературе немногочисленны и лишь для ряда ПП проведено измерение величины [η] при температуре 25⁰ С. Ценную информацию о конформационных изменениях полимерной цепочки под воздействием различных факторов, обусловленных взаимодействием сегментов полимерной цепочки окружающими их молекулами растворителя, ассоциации и диссоциации макромолекул пектинов, можно получить в ходе изучения температурной зависимости [η] [101-106].

В работе [103] изучена зависимость [η] цитрусового пектина (Sigma, ГК \geq 74.0 %, СЭ 6.7 %) от температуры, авторы исходя из значения числа Шима равное 10.5 и найденных значений параметра уравнения Марка-Хаувинка-Сакурада (М-H-S) \boldsymbol{a} от 0.8232 до 0.8129 при температурах 25-50 0 С предполагают, что этот пектин в водном растворе принимает конформацию стержня.

Авторы [104] при изучении молекулярного веса M_w и коэффициента f/f_o , отношения $log[\eta]$ от $log\ M_w$ для ВМ-пектина из цитрусовых при различных температурах (20-60 0 C), определением значения коэффициента в уравнении Марка Хаувинка (a =0.84), обнаружили, что этот пектин имеет полужесткую вытянутую конформацию, и эта конформация не изменяется от температуры. Найденное среднее весовое число сегментов Куна из данных седиментации

показало, что оно уменьшается от (170 ± 10) до (125 ± 10) с увеличением температуры от 20 до 60° С.

Позднее, работе [105] ЭТИМИ авторами В при изучении же гидродинамических свойств серии пектинов с различными СЭ обнаружили, что все изученные пектины принимают полужесткую конформацию конформацию вытянутых клубков. Они также заявляли о влиянии СЭ на конформационное изменение пектиновых цепей. Однако характер большое распределения значение решение ЭТИХ групп имеет конформационных изменений пектиновых цепей, также степень разветвленности этих биополимеров существенно влияет на структуру цепей в растворе [105].

В лаборатории Химии высокомолекулярных соединений Института химии им. В.И. Никитина АН РТ было изучено влияние температуры на вязкостные характеристики пектинов, полученных из цитрусовых, яблок и корзинок подсолнечника в диапазоне температур 20-60 С и рассчитаны значения энергии активации течения пектиновых растворов (Еа) от наклона прямых dIn [ŋ]/d(l/T). Рассчитанная энергия активации процесса течения растворов (Еа), была выше для подсолнечного и яблочного пектинов, меньше для НМ-пектина из коммерческого цитрусового и ВМ-пектина из корок апельсинов. Это свидетельствует о том, что полимерная цепь с большей молекулярной массой, является более гибкой, чем с меньшей массой [106]. Воздействие температуры на природу растворителя также было изучено путем анализа постоянной Хаггинса (Kh) от температуры. Увеличение температуры в случае с НМ-пектинами (подсолнечный и коммерческий цитрусовый) приводит к уменьшению Kh в области изменения температуры от 20 до 40° C, затем к возрастанию между 40 до 50° С и вновь уменьшается. Изменение Кh указывает на то, что вначале температура благоприятствует диссоциации карбоксильных групп, а увеличение температуры до $40\text{-}50^{\circ}$ С ведет к межмолекулярному взаимодействию, затем агрегированные макромолекулы разрушаются. В случае с ВМ-пектинами (апельсиновый и яблочный) увеличение температуры приводит к уменьшению Кh, как и с другими полимерами. При $30\text{-}40^{\circ}$ С использованный растворитель является подходящим для всех пектинов, за исключением подсолнечного пектина и значение Kh близко к θ -растворителю.

По литературным данным [77,102-109] конформация макромолекул пектиновых веществ может варьироваться от жесткой цилиндрической формы до гибкой спирали. В частности, низкомолекулярные, ВМ-пектины и пектовая кислота [поли (α-D-галактуроновая кислота)] принимают жесткую линейную конформацию [108,109]. В то же время высокомолекулярные и НМ-пектины, принимают форму клубка [76,106,109]. Ионизация из таких цепей должна быть хорошо описана теорией Маннинга [110,111]. Тем не менее, ионы Na⁺ не в состоянии заставить цепь принять жесткую и более компактную конформацию, даже при самых высоких концентрациях противоионов [109].

В то время детальная структура пектина, как отдельная макромолекула в естественных условиях до сих пор является предметом дискуссий [112]. Для исследования гидродинамических свойств наиболее доступны коммерческие образцы пектинов, их можно рассматривать в совокупности полимерных цепей, состоящих из линейных областей HG и RG [113]. Тем не менее, при проведении таких исследований необходимо также учитывать тот факт, что у ПП возникает сложность, связанная с химической структурой. В частности, другая этерификация карбоксильных групп пектиновых цепей как метанолом, так и этанолом бывают разной, помимо этого распределение этерифицированных групп (блочное или хаотичное) вдоль отдельных полимерных цепей также является ключевым фактором, определяющееся молекулярной функциональностью этих сложных биополимеров [114]. НС цепи ПП с блочным распределением свободных карбоксильных групп могут образовывать сшитые гели (волокнистые структуры), ПП цепи имеющие апиозные остатки могут формировать комплексы с бором, кроме того ПП также могут формировать между собой комплексы через ковалентные связи [115,116].

Авторы [117-119] при изучении ПП, модифицированными ферментами, которые имели различные СЭ, но имеющие одинаковый молекулярный вес, наблюдали значительное различие в процессе их гелеобразования и агрегации в присутствии различных низкомолекулярных катионов Li $^+$, Na $^+$ и K $^+$.

Таким образом, для исследования пектинов, отличающихся как по молекулярной массе, так и по структуре необходимо подобрать независимый подход для определения гидродинамических свойств. Несмотря на сложность получения однородной фракции пектина, изучение молекулярных и конформационных характеристик ПП становится возможным, если принимать во внимание наличие кислых и нейтральных составляющих остатков полимерной цепи и возможность сохранения постоянного значения этого параметра при изменении молекулярной массы.

1.4.2. Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение пектиновых макромолекул

Характерным показателем качества ПП является молекулярная масса. Ввиду того, что каждый ПП, как и всякий природный полимер, представляет собой смесь молекул с разной длиной цепи и определяет только средние значения молекулярной массы: средневесовой ($M_{\rm w}$), среднечисленный ($M_{\rm n}$) и z-средний ($M_{\rm z}$). Для определения средней $M_{\rm w}$ обычно используются такие методы как вискозиметрия, осмометрия, скоростная седиментация, высокоэффективная эксклюзионная жидкостная хроматография (ЭЖХ) и метод светорассеяния [76,102,120-127].

Сравнивая данные по молекулярной массе пектинов, полученные методом светорассеяния, ЭЖХ и седиментации на аналитической ультрацентрифуге, многие авторы пришли к заключению, что M_w одного и того же пектина, полученного первыми двумя методами [76,123-125], как правило, значительно выше значения, чем полученного вторым способом [120-122,127]. При интерпретации этих результатов была принята во внимание возможность образования ассоциированных агрегатов или микрогелей при выделении ПВ. Предварительная микрофильтрация, ультрацентрифугирование или очистка на сорбенте ДЭАЭ-целлюлозы, в определенной степени, сближают результаты, полученные этими двумя методами.

По данным метода светорассеяния для образцов ЯП [123] в интервале $M_{\rm w}$ от 20 до 200 КД, найдено соотношение:

$$[\eta] = 2.16 \cdot 10^{-2} M^{0.79} \tag{1.1}$$

При оценке M_w методом гельпроникающей хроматографией (ГПХ) на сефарозе 2B и сефарозе 4B найдены соответственно следующие уравнения Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = 9.55 \cdot 10^{-2} M^{0.73} \tag{1.2}$$

$$[\eta] = 8.51 \cdot 10^{-2} M^{0.68} \tag{1.3}$$

соответственно для цитрусового и пектина подсолнечника [124,125].

Для ПВ распределение по $M_{\rm w}$, как правило, достаточно широкое, часто образцы полидисперсны ($M_{\rm w}/M_{\rm n}{=}11.0$).

Авторы [116] исследовали ММР ЦП с помощью откалиброванной колонки ГЖХ с последовательным определением молекулярных масс образцов методами светорассеяния и мембранной осмометрии. Исходя из данных по угловой зависимости светорассеяния для низкомолекулярной фракции ПВ, была идентифицирована жесткая спиральная форма (α=0.98) макромолекулы. Высокомолекулярные фракции имели сферическую форму.

С целью изучения влияния M_w ПП, выделенных из отходов консервной промышленности Таджикистана на их желирующие свойства, авторами [128] было использовано сочетание методов вискозометрии и седиментации на ультрацентрифуге. Для исследования были использованы ПВ, выделенные кислотным гидролизом из выжимок яблок, абрикосов, айвы и персиков. При прочих равных условиях однократной экстракцией наиболее высокомолекулярный пектин выделяется из выжимок абрикосов. Проведенные исследование желирующей способности пектинов, показали согласованность определенных M_w пектинов этим методом.

В работе [98] данный способ применен для сравнение гидродинамических свойств промышленных пектинов. Величины средневесового молекулярного веса рассчитаны по уравнению Флори – Манделькерна, а средневязкостной М η s - с использованием уравнения [η]= $4.9.10^{-4} M^{0.79}$, найденного для яблочного пектина [98] и значение M_w определенное уравнением Флори–Манделькерном, лучше отражает гидродинамические свойства пектинов и дает больше сведений об их структуре.

В последнее время для исследования ММР применяют такие методы, как высокоэффективная ГЖХ и высокоэффективная эксклюзионная жидкостная хроматография по компонентам [76,102,127,129]. С помощью откалиброванной колонки ТЅК-РW ВЭЖХ были получены универсальные калибровочные кривые для ВМ- и НМ-пектинов яблок с различной $M_{\rm w}$. Полученные данные свидетельствуют, что константы уравнения Марка-Куна-Хаувинка приобретают конкретные значения в узких областях $M_{\rm w}$. В частности, константы, найденные для высокомолекулярных фракций ПВ, не могут быть использованы для низкомолекулярных или среднемолекулярных фракций и наоборот.

Определение формы цепи макромолекул (гибкость/жесткость) ПП играет важную роль в их структурно-функциональной взаимосвязи и, следовательно,

на их коммерческое применение в пищевой и биомедицинской отраслях. Более ранние исследования, основанные на анализе седиментации на ультрацентрифуге, сосредоточились на молекулярно-массовых распределениях и качественных и полуколичественного описаниях, согласно квадратичному уравнению и методу решения конформации Уэльс-ван Холда, с точки зрения "вытянутой" конформации [122,130].

В исследовании авторов [105], четыре вида пектина с низкой СЭ (17-27 %) и один с высокой СЭ (70 %) были охарактеризованы в водном растворе (0.1 М определением характеристической вязкости [n], коэффициентом седиментации (S_1 при 20^0 C) и значением M_w . Конформация цепи и её гибкость качественно оценивались, используя метод зонирования конформаций [86] и количественно, расчетом персистетной длиной макромолекулы (Lp), используя Богданески Ямакава-Фуджи, традиционные уравнения И отношения функции. объединены путем минимизации целевой Анализом конформации обнаружена конформация седиментационного зонирования вытянутых клубков (тип С) и персистентной длиной в пределах диапазона Lp 1/4 10-13 нм (при фиксированной массе на единицу длины).

Анализ литературных данных, представленных в данном разделе, MMP ПВ, свидетельствует, что понятие для отличие высокомолекулярных соединений, имеет специфический смысл. Для ПВ с ростом значения М_w не только изменяется размер макромолекулы, но и химическая структура полимерной цепи, которая сопровождает различные виды конформационных переходов. Поэтому при установлении взаимосвязи гидродинамических параметров и M_w пектинов необходимо иметь четкое представление о моносахаридном составе и композиционной неоднородности полимерной цепи. При этом немаловажную роль играет выбор метода исследования.

В последние годы появление нового метода АСМ микроскопии открыл новые возможности в исследовании структуры полисахаридов. По вопросу изучения структуры полисахаридов бактериального и растительного происхождения недавно было опубликовано ряд работ [76,87,88,107,131]. Метод прост в использовании и дает полезную информацию о размерах макромолекулы и жесткости ее цепи.

Из снимков, полученных методом ACM для высокоэтерефицированного цитрусового пектина, четко видно, что нерегулярность макромолекулы увеличивает его гибкость и уменьшает размеры макромолекулы [76,87,88,131].

Изображения с ВМ цитрусового пектина, нанесенных из раствора и сахарных гелей, были получены с помощью АСМ. Впервые, изображения пектина, нанесенного из воды показали, что переход от пектиновых нитей к отдельным молекулам или их агрегатов происходит при концентрациях от 6.5 до 13.1 мкг/мл. При концентрациии 6.5 мкг/мл, формы макромолекулы видны в виде стержня, сегментированные стержни, перекрученные палочки, кольца, разветвленные молекулы и плотные круговые точки. При увеличении концентрации до 13.1 мкг/мл, все эти формы были объединены в агрегатные нити. Эти же структуры были различимы в гелях пектинов с высоким содержанием метоксильных групп в присутствии сахаров и кислоты. Таким образом, можно было бы рассмотреть пектиновые цепы в воде при концентрациях, превышающих 10 мкг/мл в качестве отдельных набухших предшественники нитей в гелях. Исследование АСМ изображений показало, что гели с "единым" распределением нитей образовывали гель с более высокой прочностью, чем гели в которых нити были неравномерно распределены и были разделены большими и малыми пространствами.

Несмотря на начальные успехи, данный метод нуждается в экспериментальном подходе для получения четких снимков при разных условиях. Указанный метод открывает новые возможности в исследовании структуры и поведении макромолекул в растворе и гелях.

Таким образом, все физико-химические данные подтверждают, что вторичная структура изолированных цепей пектина находится в близком соответствии со структурой родственных полисахаридов. Необходимо отметить, что конформационное изменение пектиновых макромолекул в основном зависит от включения в цепь остатков рамнозы и СЭ карбоксильных групп.

ГЛАВА ІІ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Характеристики исходных веществ

Растворители были очищены по общепринятым методикам. Неорганические соли, щелочи и кислоты, применяли марки «х.ч» или «ч.д.а» производства «Реахим», молекулярные стандарты Пуллулана (Showa Denko K.K., Japan) и серии декстранов (Т10-Т500), Millipore Millex 0.45 мкм.

В качестве объектов исследования использовались следующие пектины (табл. 2.1).

Таблица 2.1 Характеристика пектинов

Пектины	ГК, %	СЭ, %	HC, %	М _w , КД	a
Яблочный (ЯП 85-60-2.0)	64.80	55.88	22.60	137.0	0.960
Апельсиновый (АП 85-60-2.0)	77.76	70.74	17.93	257.0	0.698
(Цитрусовый)	77.70	70.74	17.93	237.0	0.098
Подсолнечный (КП 85-60-2.0)	69.6	48.50	8.98	95.4	0.938
Подсолнечный (КП 120-5-2.0)	74.0	26.6		181	
Тыквенный (ТкП 85-60-2.0)	64.8	48.7		673.9	
Тыквенный (ТкП 120-5-2.0)	71.5	46.8		769.5	

2.1.1. Подготовка исходного сырья

Корзинки подсолнечника готовили после сбора урожая. Крупные и здоровые корзинки, разрезали на маленькие куски и сушили на открытом воздухе. После чего измельчали с помощью лабораторной мельницы Retsch LM 200 (Германия) до размера частиц 0.1-0.4 мм. Измельченное сырье помещали для дальнейшего хранения в полиэтиленовые мешки.

2.2. Методы получения, очистки и анализа пектиновых полисахаридов

2.2.1. Традиционный метод выделения и очистки пектиновых полисахаридов из растительного сырья

Традиционный метод (ТМ) [23,28,29,40,41,98,131], гидролиз — экстракцию ПП из растительного сырья проводили в течение 60 мин, при температуре 85°C, гидромодуле 1:20 и непрерывном перемешивании, используя в качестве экстрагента раствор соляной кислоты при рН=1.2-1.8 в зависимости от вида источника. Полученный экстракт отделяли от остатков клеточной стенки и разделяли на три фракции, условно названные: микрогель (МГ), пектиновые вещества (ПВ) и олигосахариды (ОС).

2.2.2. Новый метод гидролиз-экстракции пектиновых полисахаридов (флэш-метод)

Для получения ПП в работе использовали метод быстрой гидролиз экстракции пектина в автоклаве под давлением за короткий промежуток времени (далее – флэш-метод) [15,33]. Набухшее сырьё помещали в автоклав, добавляли раствор соляной кислоты в соотношении сырьё: кислота 1:20 и проводили гидролиз при $t=120^{0}$ С и P=1.5 атм в течение 3-10 мин. Давление в автоклаве автоматически контролировалось паровым инжектором (паровой генератор MBA – 20D США). Пектиновый гидролизат отфильтровывали через плотный лавсан, полученный экстракт охлаждали, нейтрализовали до рН 3.5, отделяли микрогель (МГ) путем центрифугирования при скорости 4000 – 5000 об/мин. Далее, проводили осаждение раствора трехкратным количеством этилового спирта для выделения пектиновых веществ (ПВ). Оставшийся водно спиртовый раствор упаривали на роторном испарителе, отделяя олигосахариды (ОС).

2.2.3. Очистка пектиновых веществ

Очистка этанолом. Пектиновые вещества обрабатывали смесью 70 %-ного C_2H_5OH , концентрированной HCI и воды в соотношении 14:3.6:2.4 в течение 24 часов при комнатной температуре. После этого промывали 70 %-ным раствором спиртом до отрицательной реакции на CI $^-$ - ионы, затем 96 %-ным этанолом и ацетоном и высушивали при температуре 40-60 0 C.

Для удаления микрогеля 0.5 %-ный раствор пектина центрифугировали при 7100 центробежной скорости (g) в течение 1.5 ч, или ультрацентрифугировали при 60 000 g в течение 1 ч [40,41,98].

Мембранная очистка ПВ. Наряду с методом осаждения для получения ПВ был использован метод диа- и ультрафильтрации с помощью мембраны УПМ- 100 на лабораторной ячейке при давлении 0.16 МПа, с последующей лиофилизацией очищенных растворов ПВ [67].

2.3. Количественные методы анализа пектиновых полисахаридов

2.3.1. Модифицированный титриметрический метод

Определение свободных карбоксильных групп. Навеска (около 0.1 г) высушенного образца смачивается 96 %-ным этанолом, добавляется 100 мл H_2O и перемешивается на магнитной мешалке до полного растворения (1.5-2.0 час) [132,133]. Затем аликвота (10-20 мл) титруется 0.1 н раствором гидроксида натрия потенциометрически до pH=7.5. Содержание свободных гидроксильных групп (K_c) в процентах рассчитывается по формуле:

$$K_c = \frac{N_{\text{NaOH}} \bullet V_{\text{NaOH}} \bullet 0.0045}{0.1q} \bullet 100$$
 (2.1)

где q- масса очищенного пектина, содержащаяся в аликвоте (1мл 0.1 н раствора NaOH соответствует 0.0045 г карбоксильных групп).

Определение этерифицированных карбоксильных групп. К оттитрованному раствору приливается точно 5 мл 0.1 н раствора NaOH, плотно закрывается, и оставляют на два часа при комнатной температуре (20-40⁰ C) для полного омыления. Избыток щелочи оттитровывается 0.1 н раствором HCl потенциометрически до резкого скачка рН. Параллельно проводится холостой опыт. Содержание этерифицированных карбоксильных групп (Кэ) в процентах рассчитывается по формуле:

$$K_{9} = N_{HCl} \bullet \frac{(V_{HCl}^{1} - V_{HCl}^{11}) \bullet 0.0045}{0.1q} \bullet 100$$
 (2.2)

где $V^1_{\ HCI}$ - объем раствора HCI нормальности N, израсходовавшегося на титрование холостого опыта;

 V^{11}_{HCI} - объем раствора HCI , израсходовавшегося на титрование пробы; q - масса ПВ, содержащегося в аликвоте, г.

2.3.2. Определение количества свободных и этерифицированных карбоксильных групп с помощью ИК-Фурье спектроскопии

С помощью ИК-Фурье спектроскопии были записаны спектры сухих образцов пектинов с использованием прибора Spectrum 65 FT-IR (Perkin Elmer, Шейцария). Спектрометр оснащен приставкой нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), (Attenuated total reflection-ATR, MIRACLE) с кристаллом ZnSe [134]. Каждый записанный спектр был получен в среднем из 16 - 20 сканирований, которые варьировались в диапазоне от 4000 см⁻¹ - 600 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹. Измерения проводились на предварительно высушенных образцах, после снятия фонового спектра, записанного перед каждым анализом. Каждый спектр был проанализирован с помощью программного обеспечения Рerkin Elmer Spectrum, версия 10.03.07. Повторные измерения каждого спектра

показали сдвиг от предыдущего не более 2 %. Содержание этерифицированных карбоксильных групп в процентах рассчитывается по формуле:

C
$$\ni$$
=((455 ±20)*(A₁₄₃₉/A₁₀₁₅))+(2±5) (2.3)

где 455 – постоянное значение;

 A_{1439} и A_{1015} –площадь под пиков при частоте спектров, 1439 см⁻¹и 1015 см⁻¹; 2 – процент отклонения при серийной записи, как описано в [135].

2.3.3. Определение уроновых кислот с помощью метагидроксидифенильного метода

Используют готовый стандартный раствор ГК или образца ПВ с концентрацией 100 мкг/мл. Перед растворением стандарта или образца их необходимо поместить в вакуум на сутки. Работать можно максимум с 10-ю пробирками. Готовят серию растворов для построения калибровочной кривой: 25 %, 50 %, 75 % и 100 %.

В пробирку помещают 0.4 мл раствора, добавляют 40 мкл 4 молярного раствора сульфаминовой кислоты. Пробирки закрывают и перемешивают. Далее, помещают в сосуд с водой и льдом, осторожно приливают 2.5 мл раствора тетрабората натрия в серной кислоте.

Пробирки встряхивают в охлажденной смеси и нагревают 15 минут в кипящей водяной бане. После этого, пробирки охлаждают в сосуде с водой и льдом в течение 1 — 1.5 мин. Далее, в пробирки добавляют 80 мкл 0.5 % - ного раствора метагидроксибифенила и оставляют на 3 минуты. После чего, пробирки перемешивают до появления окраски. Оптическую плотность измеряют при 525 нм (окраска стабильна в течение 13 минут) [136]. Содержание ГК вычисляют по формуле.

$$X=a \cdot V_2 \cdot V \cdot 100/ H \cdot V_3 \cdot V_1 \cdot 1000000$$
 (2.4)

где а – содержание ГК в пробе, найденное по калибровочной кривой, мкг;

Н – масса навески, г;

V – объем, экстракта, полученного из навески, мл;

V1 – объем, взятый для разведения, мл;

V2 – объем, полученный после разведения, мл;

V3 – объем пробы, взятой для реакции, мл;

100 – коэффициент перевода в проценты.

Построение калибровочной кривой ГК (м – гидроксидифенильный метод).

Готовили стандартный раствор ГК с концентрацией 100 мкг/мл. Путем разбавления была приготовлена серия растворов для калибровки: 25 %, 50 %, 75% и 100 %. Для повышения достоверности результатов также готовили растворы: 20 %, 40 %, 60 % и 85 %. Дальнейшие исследования проводились по методу 2. На основании полученных данных строили калибровочную кривую галактуроновой кислоты.

2.3.4. Определение молекулярной массы и молекулярно-массового распределения пектина методом эксклюзионной жидкостной хроматографией

Молекулярную массу пектина определяли ЭЖХ [75]. В зависимости от вязкости раствора пектина, высушенный образец растворяли в 0.05М NaNO₃ до конечной концентрации 1 или 2 мг/мл, центрифугировали при 20 000 g в течение 20 минут, для отделения агрегированной фракции, фильтровали через мембранный фильтр (0.45 мкм, Millipore Millex – HN). Количество пробы (0.1 – 0.2 мл) и скорость потока элюента (0.8 мл/мин) задавалась с помощью программы Breez (Waters). Система доставки растворителя состоит из двухканального вакуумного дегазатора, насоса высокого давления (Waters 1515 Isocratic Pump), и автоинжектора (717 Plus AutoInjector, Waters). Для разделения пектиновых полисахаридов использовали две колонки, содержащие PL-Aquagel ОН40 и PL-Aquagel ОН60. Молекулярная масса пектинов определялась с

использованием программного обеспечения ASTRA 5.3.4.13 (Wyatt Technology). Значения для M_w были получены на ЭЖХ с использованием универсальной калибровки. ЭЖХ колонки калибровались с использованием молекулярных стандартов Пуллулана (Showa Denko K.K., Japan).

Значения M_w, M_w/M_n и RMS радиус очищенных ПП образцов также были определены с помощью ЭЖХ системы в сочетании с детектором многоуглового лазерного светорассеивания (МУЛС, HELEOS II, Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, США), УФ (UV, Wyatt Technology), вискозиметрического (Viscostar II, Wyatt Technology) и рефрактометрического (REX, Wyatt Technology) детекторов. Для ЭЖХ разделения ПП в первом использовали две колонки, содержащие PL-Aquagel OH40 и PL-Aquagel OH60, а во втором методе колонки фирмы Tosoh GMPWxl columns - TSKgel GMPWxl (7.8 mm ID x 30 cm, 13 M_w в области 5 x 10 -2-8 x 10-6). Молекулярная масса пектинов определялась с помощью программного обеспечения ASTRA 5.3.4.13 (Wyatt Technology). Значения для M_w были получены с использованием универсальной калибровки и Zimm 1st order для многоуглового лазерного ЭЖХ светорассеивания соответственно. колонки калибровались использованием молекулярных стандартов Пуллулана (Showa Denko K.K., Japan) и серии декстранов (T10-T500). Значение инкремента dn/dc, равного 0.134, было заимствовано из работы [137]. Молекулярная масса пектинов определялась с помощью программного обеспечения ASTRA 5.3.4.13 (Wyatt Technology).

2.3.5. ¹Н и ¹³С и HSQC ЯМР-спектроскопия

Для анализа структуры методом ЯМР спектроскопии были использованы фракции ПП из корзинок подсолнечника [138,139] и плодов тыквы[140]. ЯМР спектры были сняты на приборе 14 Tesla Agilent VNMRS NMR spectrometer (Santa Clara, CA, США). Спектры 1 Н и 13 С регистрировались при 40^{0} С в

растворе $Д_2O$ в системе с 5 мм ампулой, помещенной в пульсирующее поле направленной в ось-z. В качестве эталонного соединения для отсчета химического сдвига использовали натриевую соль 3-(триметилсилил)-пропионовой кислоты (ТСП) для обоих ядер. Спектры 1 Н были сняты при частоте 600 МГц, диапазон измерения химического сдвига 12 м.д., ширина пульсации импульсов 450 и время задержки релаксации 4 сек. Спектры 13 С записывались при частоте 150 МГц со шкалой диапазона до 250 м.д., время задержки релаксации 1 сек., в режиме 50-80 тысяча повторных накопления (сканированием) [139].

Двумерные эксперименты градиентной версии гетероядерные протонуглеродные корреляционные спектры (gHSQC ЯМР) с высоким разрешением проводились с использованием адиабатической пульсации. Спектры получены в диапазоне химических сдвигов 12 м.д. для спектров ЯМР ¹Н и 200 м.д. для спектров ЯМР ¹³С с применением 4092 точек при прямом измерении и еще 400 дополнительно во втором измерении, производилось 64 сканирования, задержка релаксации между запусками составила 2 сек.

ГЛАВА III. СТРУКТУРНЫЕ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ НОВЫМИ МЕТОДАМИ

3.1. Влияние технологических параметров инновационного метода на структуру, физико-химические и гидродинамические свойства пектиновых полисахаридов различного происхождения

3.1.1. Флэш-метод гидролиза пектинов различного происхождения

В данной работе рассматривается процесс гидролиз-экстракции пектиновых полисахаридов с применением быстрого гидролиза и экстракции «флэш-метода» [15,31,33] под давлением.

В соответствии с патентованным методом [15], сырьё, содержащее пектин подаётся в автоклав при требуемой температуре 110-140° С и давлении 1.2-1.5 атм. Гидролиз-экстракция пектина проводится в течение 3-10 минут при низких значениях рН раствора. Для сравнения качества ПП гидролиз-экстракцию проводили также традиционным методом, соответственно для каждого вида сырья [14,23,101]. Пектиновый гидролизат отфильтровывают с использованием фильтрующего материала. Полученный экстракт охлаждают, нейтрализуют до рН 3.5, отделяют микрогель (МГ) центрифугированием при скорости 4000 – 5000 об/мин.

В качестве сырья использовали выжимки яблок красных сортов из Муминабадского (ЯМ) и Файзабадского районов (ЯФ), айвы (Ай), абрикосов (Аб), персиков (Пр), лимонных корок (ЛК), стебли и листья ревеня (Рв), плоды тыквы (Ткв) и корзинки подсолнечника (КрП) [14,15,138-142].

В табл. 3.1 представлены численные значения выхода фракций из различного сырья, в зависимости от способа проведения гидролиз – экстракции. Суммарное содержание МГ, ПВ и ОС для каждой фиксированной

продолжительности реакции гидролиз-экстракции составляет содержание ПП, распадающегося за этот период времени.

Таблица 3.1 Выход фракций ПП растительного сырья в зависимости от метода получения

Выход фракций ПП, %										
C	MI	7	ПЕ	}	OC					
Сырье	TM	флэш	TM	Флэш	TM	флэш				
MR	3.60	2.60	14.25	23.60	24.65	28.00				
ФR	2.00	2.26	22.00	22.37	20.60	31.87				
Ай	1.40	4.50	11.40	12.40	25.90	56.50				
Аб	1.22	3.76	4.86	7.05	37.92	69.19				
ЛК	2.00	2.06	19.00	20.06	23.80	45.84				
PB	1.11	3.18	12.36	17.50	35.03	29.32				
Пр	0.86	4.28	6.49	7.20	37.85	43.36				
Ткв	1.19	8.68	2.24	3.77	73.71	76.92				
КрП	4.30	8.20	10.20	24.68	13.40	7.50				

Для всех видов сырья, суммарный распад ПМ при флэш-гидролизе значительно превышает аналогичный показатель, полученный при ТМ. Как следствие этого, содержание КС имеет обратную зависимость. Численные значения выходов ПВ и ОС существенно возрастают при применении метода быстрой экстракции, за исключением ревеня скального (табл. 3.1). Для данного вида сырья характерен более высокий выход ОС при традиционном методе. В то же время, выход ПВ из стеблей и листьев ревеня скального выше при флэшметоде. При этом, суммарный распад ПП остается практически неизменным как при традиционном методе, так и при флэш - методе.

Данный факт вызван, скорее всего, особенностью строения клеточной стенки растительного сырья. Для всех видов растительного сырья, за исключением выжимок ЯМ красное, выход МГ значительно выше при проведении гидролиз—экстракции в автоклаве. Очевидно, данный сорт яблок отличается более рыхлой структурой клеточной стенки, т.е. связь ПП с

гемицеллюлозами клеточной стенки слабее, чем у прочих видов сырья. Под воздействием высокой температуры и давления, сетчатый полимер - МГ диффундирует из сырья в раствор — гидролизат и, претерпевая деградацию, трансформируется в ПВ. Правильность данного предположения подтверждает резкое увеличение выхода ПВ из ЯФ при инновационном методе.

Применение данного метода позволило сократить продолжительность процесса гидролиз-экстракции до нескольких минут и оптимизировать значение выхода продуктов распада протопектина растительного сырья.

3.1.2. Физико-химические и гидродинамические свойства ПП различного происхождения

Содержание ГК, СЭ и молекулярная масса - важнейшие факторы, определяющие качество ПП [141-144], поэтому их регулированию должно быть уделено особое внимание. Как известно [105,145], воздействие высокой температуры и давления часто приводят к снижению молекулярной массы, но применение флэш-метода за короткое время, напротив, несколько увеличивает данный параметр, по сравнению с аналогичными ПВ, полученными при помощи традиционного метода, практически не оказывая при этом влияния на значение СЭ (табл. 3.2).

Данные, представленные в табл. 3.2 и 3.3, наглядно демонстрируют особенности процесса гидролиза протопектина различного растительного сырья. В частности, пектиновые образцы, полученные из ЯМ, Аб и Ткв флэшметодом устойчивы к повышенной температуре, отличаются большим значением молекулярной массы по сравнению с аналогичными образцами, полученные традиционным методом. В данных пектинах наблюдаются аномалии, связанные с агрегацией макромолекул (МГ). Как видно, чем больше М_z у пектина, тем больше его молекулы подвержены агрегации, за исключением ПВ ЛК. Скорее всего, данный факт объясняется особенностями структуры

молекулы пектина. Молекулярная масса ПВ, показатель полидисперсности (M_w/M_n) и содержание агрегированной фракции (АГ) в ПВ представлены на рис. 3.1 и в табл. 3.3.

Таблица 3.2 Содержание звеньев галактуроновой кислоты и степень этерификации ПВ в зависимости от метода получения

Crimia	Ι	TK,%	СЭ,%		
Сырье	TM	шелФ	TM	шелФ	
ЯВ М	70.00	70.00	52.00	52.17	
ЯВ Ф	49.8	50.40	71.59	68.60	
Ай	66.00	67.20	58.24	57.14	
Аб	66.00	67.20	54.65	52.87	
ЛК	72.24	74.40	76.74	74.42	
Пр	65.28	66.00	94.94	94.87	
Ткв	64.80	71.50	48.71	46.79	
КрП	74.00	76.00	26.60	32.00	

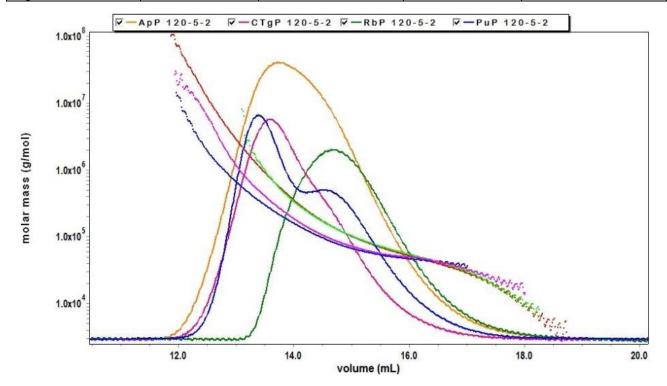


Рисунок 3.1. Кривые молекулярно-массового распределения пектинов на ЭЖХ с использованием сочетания визкозиметрического и рефрактометрического детекторов, полученных ТМ и флэш-методом [75].

Таблица 3.3 Сравнительные молекулярные характеристики ПП разного происхождения, полученных ТМ и Флэш методами гидролиза

Crinia	М _w ·e⁻³, КД		M_w/M_n		М _z ·е ⁻³ , КД		MΓ, %	
Сырье	TM	Флэш	TM	Флэш	TM	Флэш	TM	Флэш
ЯМ	134.00	309.40	3.80	9.50	1133	4473	23.50	20.00
ФR	120.00	92.50	5.60	4.50	4743	1558	36.50	18.50
Ай	176.00	112.40	4.35	2.80	7309	613	25.00	8.50
АбВ	114.50	718.00	4.70	10.90	755	12500	18.50	8.50
ЛК	107.80	82.29	2.89	9.31	267	387	18.50	16.00
PB	268.00	114.00	4.80	2.30	1479	338	26.50	49.00
Пр	243.80	65.50	6.30	3.07	2103	145	14.50	23.00
Ткв	673.90	999.70	1.93	2.74	2069	4112	17.70	40.00
КрП	142.40	181.00	3.22	5.00	1793	1374	40.00	33.50

Настоящее исследование продемонстрировало преимущество применения флэш-метода гидролиз-экстракции. Получение ПП при помощи данного метода приводит К значительному увеличению выхода целевых продуктов, положительным образом сказываясь на качестве пектинов, молекулярной массе и ММР. Использование инновационного метода позволяет проводить гидролизэкстракцию любого сырья, избегая длительного контактирования с высокой температурой и агрессивной средой, не изменяя при этом технологических показателей гидролиз-экстракции, что дает возможность сократить энергоемкие и дорогостоящие процессы в производстве пектина. Пектины, полученные в соответствии с параметрами предлагаемого способа, гидролиз-экстрагирование твёрдой фазы в режиме автоклавирования, обладают высокими значениями молекулярной массы, содержанием галактуроновой кислоты и оптимальной СЭ. Причем полученные пектины имеют узкое распределение по молекулярной массе (низкие коэффициенты полидисперсности) и менее агрегированы (содержат меньше микрогеля).

Кроме гибкости технологической линии, короткий контакт полученных ПП с кислым раствором, разработанная технология позволяет перерабатывать любые виды пектинсодержащего растительного сырья [15,32,33,140,141,146-148], обладает ещё и рядом преимуществ перед существующим уровнем техники по простоте и экологичности производства.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получать пектин с оптимальными параметрами по молекулярной массе, содержанию ГК и СЭ, что делает возможным его применение в различных областях пищевой и фармацевтической промышленностях.

3.2. Влияние параметров флэш-гидролиза на физико-химические свойства НМ – пектина из плодов тыквы, полученного флэш-методом

В настоящее время спрос на пектин на мировом рынке постепенно растет. Традиционными источниками сырья для производства пектина являются альбедо цитрусовых корок и выжимки яблок. Пектин из сахарной свеклы и корзинок подсолнечника является потенциальным источником для получения НМ-пектина, однако из-за отсутствия научно обоснованной технологической линии производства, коммерциализация их производства не налажена. С этой точки зрения очень интересным и перспективным сырьём могут являться также плоды тыквы [11,12,17,18,140].

Огромные сырьевые запасы и относительно низкая стоимость сырья дают предпосылки для разработки технологии получения тыквенного пектина. К настоящему времени, к сожалению, состав и свойства полисахаридов этого ценного сырья являются малоизученными. Учитывая вышесказанное, целью данной работы было изучение процесса распада ПМ тыквы, влияния параметров процесса экстракции на выход, основное физико-химические и молекулярно-массовое параметры пектиновых полисахаридов.

Сравнительные исследования процесса распада ПМ тыквы под воздействием параметров процесса различных методов гидролиза, представлены в табл. 3.4.

Таблица 3.4 Значения выхода продуктов распада ПМ (в % по отношению к массе исходного сырья) и физико-химические параметры ПВ тыквы, полученные флэш-методом $(120^{0}\,\mathrm{C},\,\mathrm{t=3-10}\,\mathrm{мин})$ и ТМ $(85^{0}\,\mathrm{C},\,\mathrm{t=60}\,\mathrm{мин})$

Темп., ⁰ С	t, мин	ПΓ,	ПВ+МΓ,	OC, %	ПП сумарный, %	Остаток КС, %	ΓK, %	СЭ, %
85	60	2.29	2.84	32.61	5.13	62.26	64.80	48.71
120	3	7.16	1.77	32.15	8.93	58.92	62.00	52.51
120	5	9.34	4.78	45.00	14.12	40.88	71.50	46.79
120	7	10.05	4.97	63.84	15.02	21.14	70.80	43.35
120	10	10.82	5.98	67.46	16.80	84.26	61.20	41.29

Данные, приведённые в табл. 3.4 показывают, что для плодов тыквы характерно предельно высокое значение суммарного распада ПМ. Даже под воздействием низкой температуры при традиционном методе гидролиза, величина выхода ПП составляет 37.74 %. При 3-х минутной продолжительности флэш-экстракции суммарный выход ПП составляет 41.08 %. С увеличением времени данное значение возрастает, достигая в конце процесса 84.26 %. Остаток КС тыквы в процессе закономерно снижается, составляя 15.74 % при 10-минутном гидролизе [138].

Таким образом, в процессе быстрой экстракции происходит практически полный распад ПМ тыквы.

Данный пектин характеризируется высоким содержанием нерастворимой части пектинового геля, который при охлаждении раствора гидролизата выпадает в виде геля, названным, в дальнейшем, как пектиновый гель (ПГ). Из

оставшегося раствора выделяли МГ, центрифугированием при 20~000~g и затем осаждением спиртом ПВ [45].

Выход ПГ в начале процесса быстрой экстракции в 3 раз превышает аналогичное значение, полученное в обычных условиях гидролиза (85° C, t=60 мин). Далее, с увеличением продолжительности процесса суммарный выход МГ и ПВ растет за 5 минут и достигает максимального значения за 10 мин (5.98 %). В итоге с помощью флэш-метода выход ПП достигается более 16 %, где большую часть ПП составляет гелевая фракция.

Отличительной особенностью плодов тыквы является высокое содержание агрегированного HG и олигосахаридов, численное значение выхода которых возрастает при увеличении продолжительности процесса, стабилизируясь при 5 минутной экстракции.

В начале процесса быстрой экстракции содержание звеньев ГК в ПВ тыквы не превышает аналогичный показатель ПВ, полученных традиционным методом (64.8 и 62.0 %, соответственно). С ростом продолжительности процесса, изменение содержания звеньев ГК носит экстремальный характер. При этом максимум приходится на 5-минутную экстракцию (71.5 %). Далее, содержание ГК снижается, вероятно, за счет экстракции фракции ПП с преобладанием RG части либо гемицеллюлоз из КС, достигая в конце процесса 61.2 %. Данный факт подтверждает неравномерность распределения ПП в клетлчной стенки тыквы.

Другим показателем, характеризующим ПВ тыквы, является значение степени этерификации (41–52 %), данный пектин можно отнести к НМ-пектинам. При этом способ проведения гидролиз-экстракции, а также продолжительность процесса мало оказывают влияние на СЭ пектиновых веществ тыквы.

Растворимый пектин (ПВ), ПГ и ОС фракции имеют потенциальную коммерческую ценность в качестве источника функциональных пищевых добавок. Метод флэш-экстракции не оказал существенного влияния на СЭ ПВ, но было трудно определить СЭ нерастворимой части ПП, для ПГ и МГ фракций из-за их плохой растворимости. Для оценки СЭ этих фракций мы применяли метод Фурье-ИК-спектроскопии с НПВО приставкой [134,135]. Для проведения детального структурного анализа, мы использовали фракции ПВ, ПГ и МГ, полученного флэш-методом при оптимальном режиме гидролиза, т.е. 5-минутного гидролиза.

3.2.1. Влияние параметров флэш-гидролиза на структурные характеристики ПП из плодов тыквы

ИК Фурье-спектры были сняты с помощью ZnSe призмы HПВО приставки для фракции ПВ, ПГ и МГ в сухом виде на Spectrum 65 FT-IR (Perkin Elmer). ИК-спектроскопия образцов фракции ПП тыквы показали характерные полосы поглощения для гомо- и рамногалактуронанов пектиновых цепей. В спектрах пектинов плодов тыквы в области частот 3600-3000 см⁻¹ наблюдаются полосы поглощения, обусловленные валентными колебаниями гидроксильных групп, в области 2920 см⁻¹ – полоса, соответствующая симметрическим колебаниям С-Н и полоса в области 2850 см⁻¹ соответствует валентным колебаниям С-Н группы (рис. 3.2).

Спектральная область 1740-1700 см⁻¹ характерна для недиссоциированных и метилированных карбоксильных групп, а полосы поглощений при 1650-1550 см⁻¹ — для ионизированных карбоксильных групп. Полосы колебаний эфирных связей при 1236-1200 см⁻¹ могут свидетельствовать о наличии в образцах ацетильных групп, а область 1200-900 см⁻¹ — связана с колебаниями пиранозных циклов ПП.

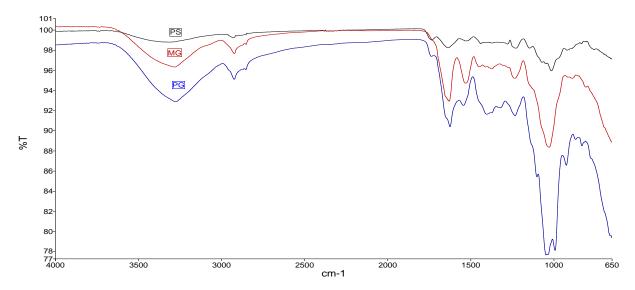


Рисунок 3.2. ИК-Фурье НПВО спектры пектинового вещества ПВ (PS), микрогеля МГ (MG) и пектинового геля ПГ (PG).

Различия в ИК-спектрах не только для частот колебаний основной цепи макромолекулы НG (С-С колебаний 900-1200 см⁻¹, С-Н симметричные при 2850 см⁻¹ и асимметричные при 2922 см⁻¹ валентных колебаний пиранозного цикла), но и в интенсивности полос поглощения, характерные для карбонильной группы в области 1600-1800 см⁻¹ (рис. 3.2). Полосы, обнаруженные во всех трех фракциях при 1531 и 1535 см⁻¹ относятся к ароматическим соединениям (возможно, фенольным соединениям). Интенсивность полос поглощения ароматических соединений для МГ была выше, чем для ПГ и ПВ соответственно, что свидетельствует об их доминирование во фракции МГ.

Значения СЭ, которое приводится в табл. 3.4, также для нерастворимых фракций ПГ и МГ были рассчитаны из площади пиков метильных групп ИК-Фурье спектров, как показано на рис. 3.3 и описано в экспериментальной части (2.3.2). Таким образом, найденные значения СЭ для ПГ и МГ с помощью этого метода составляли 2.0 и 9.2 % соответственно.

 1 Н и 13 С ЯМР спектры для растворимой фракции ПВ ПП приведены на рис. 3.4.

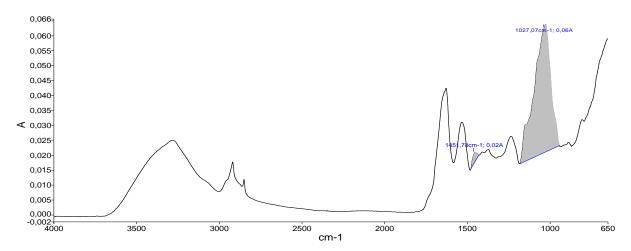


Рисунок 3.3. Расчет СЭ по площади пиков метильных групп при частоте спектров, 1439 см^{-1} и 1015 см^{-1} .

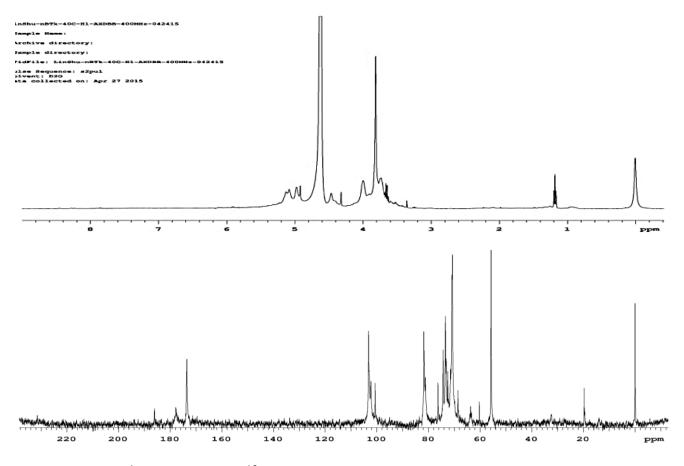


Рисунок 3.4. 1 Н (вверху) и 13 С (внизу) ЯМР спектры (снятые при 600 МГц, в D_2 О и 40^0 С) фракции ПВ, выделенных из плодов тыквы.

К сожалению, из-за плохой растворимости в воде двух гелевых фракций плодов тыквы было невозможно записать спектры ЯМР этих образцов. Даже было трудно растворить в воде образец фракции ПВ, из-за высокой склонности их к агрегации, так как у этой фракции были очень высокие значение M_w и M_z, и низкая СЭ. Следовательно, пики на спектрах были широкие, и поэтому было трудно получить спектры 2D HSQC высокого качества и их интерпретировать. ¹³С ЯМР спектры для фракции ПВ очень близки на вид к повторяющимся звеньям HG блоков. Резонансы при 101 м.д. и ~ 79 м.д. отнесены к глюкозидным атомам углерода, связей С-1 и С-4, и пики при 67-72 м.д. отнесены к другим атомам углерода пиранозного кольца, соответственно. Пики, обнаруженные при 105.8 м.д., 70.9 м.д. и 19.6 м.д., соответствуют остаткам рамнозы от RG блоков [45,147] в пектине. Однако, наличие четырех сигналов для аномерных С1, карбонильных групп и слабые сигналы метил/ацетильных групп, представленные в табл. 3.5, свидетельствуют о существовании как минимум трех блоков НС в пектине из плодов тыквы, отличающиеся по строению.

В табл. 3.5-3.7 приведены результаты анализов 1 H, 13 C ЯМР и двумерные спектры градиентных гетероядерных протон-углеродных корреляционных спектров (gHSQC) фракции ПП из плодов тыквы.

¹Н ЯМР спектры были не особенно высокого разрешения из-за широких пиков, упомянутых выше. Тем не менее, они свидетельствуют о наличии сахарных остатков. В образце фракции ПВ обнаружен триплет при 1.18 м.д. в ¹Н ЯМР спектре, который отнесен к метильной группе в данном пектине. Слабые сигналы ацетильных протонов найдены в области 1.5-2.5 м.д. Путём интегрирования интенсивности этих пиков и сравнение их с остальными протонами сахаров (между $3 \sim 6$ м.д.), относящиеся к CH_2 и C-H группам в $\Pi\Pi$

можно получить приблизительный процент метильных и ацетильных групп в образце (табл. 3.6).

Таблица 3.5 Анализ 13 С ЯМР спектров

	-CO ₂ H или -CO ₂ -		Аномер	ные атомы	Метилные/ацетильные		
		CH_3	угл	ерода	группы		
ПП	Коли-	Химичес-	Количес-	Химичес-	Количес-	Химичес-	
	чество кие слвиги			кие сдвиги		кие сдвиги	
	пиков	(м.д.)	тво пиков	(м.д.)	тво пиков	(м.д.)	
ПВ	3	173.5 177.8 186.1	~ 4	100.6 102.3 102.8 103.2	3	13.9 19.7 32.5	

Таблица 3.6 Анализ 1 Н ЯМР спектров

	Аномерный протон (за исключением сигнала НОD при 4.5~4.8 м.д.)		пира цик	Протоны пиранозных циклов Н (3.0 – 4.4 м.д.)		Ацетильный протон (2.5 ~ 1.5 м.д.)		Метильный протон (0.8 ~ 1.5 м.д.)	
	Кол.	Интег-	Кол.	Интег-	Кол.	Интег-	Кол.	Интег-	
	набл.	ральная	набл.	ральная	набл.	ральная	набл.	ральная	
	пиков	площадь	пиков	площадь	пиков	площадь	пиков	площадь	
ПВ	>6	29 %	Много пиков	66.7 %	>5	1 %	>6	~3 %	

Из анализа чувствительных фрагментов спектров gHSQC (рис. 3.5 и табл. 3.7) можно получить информацию о доминирующих сахарах, из сигналов -CH₂-группы легко определяются пики в диапазоне ~ 55 - 70 м.д. в 13 С как отрицательные и ~ 3.7 – 4.2 м.д. для 1 Н ЯМР спектров. Это свидетельствует о том, что у данной фракции существуют, по крайней мере, 4 различных сахарных остатков, отличающиеся в своем окружением. При анализе фрагментов gHSQC в сильных полях ЯМР 13 С и 1 Н спектров обнаружены

резонансы при 1.18 м.д. и сигналы при 19.6 м.д. соответственно свидетельствуют о наличии остатков L-рамнозы, вовлеченные в RG регионах макромолекулы ПП.

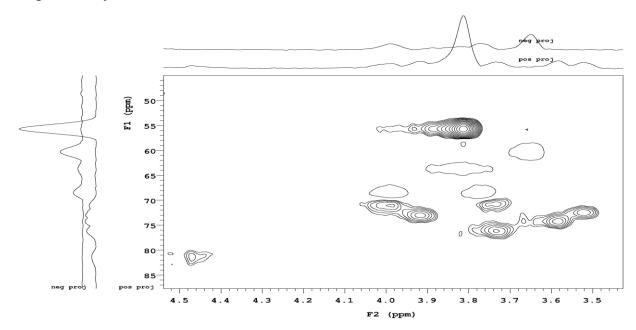


Рисунок 3.5. Фрагменты градиентных гетероядерных протон-углеродных корреляционных спектров gHSQC (средних полей от 3.5 м.д. до 4.5 м.д. для ЯМР 1 Н и 13 С при 55-85 м.д. соответственно) фракции ПВ тыквы. -CH₂-резонансы легко идентифицированы как отрицательные пики в 2D фрагментах.

3.2.2. Влияние параметров флэш гидролиза на молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПП тыквы

Учитывая тот факт, что о структуре и свойствах продуктов распада ПМ тыквы имеется незначительная информация, это требует детального изучения физико-химических и молекулярно-массовых параметров, влияющих на основные функциональные свойства целевых продуктов. Перед определением вышеназванных параметров, образцы были очищены от балластных веществ (БВ) — сопутствующих компонентов клеточной стенки (низкомолекулярных

фракций, красителей, жировосковых веществ и т.д.), которые экстрагируются в процессе гидролиз-экстракции и осаждаются вместе с пектиновыми веществами.

На рис. 3.6 представлены ВЭЖХ хроматограммы водорастворимой фракции ПП тыквы (т.е. ПВ). Каждая кривая представляет фракцию пектина, полученный ТМ и флэш методом гидролиз-экстракции при различном времени в виде зависимости $M_{\rm w}$ от объема элюирования. При длительном гидролизе и экстракции ПМ традиционным методом, формируются сложные по структуре ПП, на что указывает количество пиков на хроматограмме.

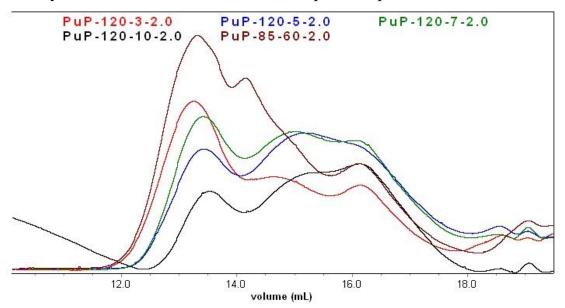


Рисунок 3.6. Эксклюзионные хроматограммы ПП плодов тыквы (PuP - ТкП), полученные флэш методом гидролиз-экстракции при (ТкП-120-3-2.0) -3 мин, (ТкП-120-5-2.0) -5 мин, (ТкП-120-7-2.0) -7 мин, (ТкП-120-10-2.0) -10 мин и ТМ (ТкП-85-60-2.0) при 85° С, t=60 мин.

Зависимость молекулярной массы от объема элюирования ПП тыквы и кривые ММР ПВ, сгенерированные с использованием программного обеспечения ASTRA для пектинов, полученных флеш методом гидролиза, приведены на рис. 3.7. Как видно, для ПП плодов тыквы, независимо от способа

получения и продолжительности процесса, характерно бимодальное молекулярно-массовое распределение, причем, если разделить бимодальные пики на две фракции, все образцы монодисперсные (M_w/M_n =1.10-2.74).

Расчёт молекулярных и гидродинамических параметров ПП определяли с помощью программного обеспечения ASTRA 5.3.4.13 и Breez (Waters), как описано в экспериментальной части.

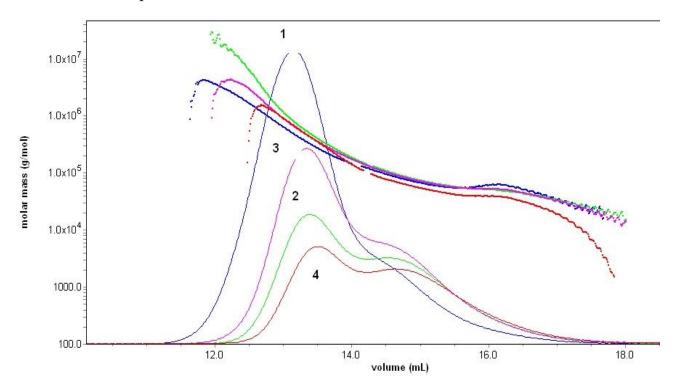


Рисунок 3.7. Зависимость молекулярной массы пектина тыквы от объема элюирования и кривые молекулярно-массового распределения ПП, полученные флэш методом гидролиза-экстракции при (1) - 3 мин, (2) - 5 мин, (3) - 7 мин и (4) - 10 мин.

Молекулярно-массовые характеристики ПВ, а также содержание АГ представлены в табл. 3.7. Из представленных в табл. 3.7 данных следует, что все образцы пектиновых веществ тыквы характеризуются высокой молекулярной массой (от 40 до 769 КД), низким показателем полидисперсности ($M_w/M_n = 1.20-2.74$) и сильной агрегацией.

Таблица 3.7 Молекулярно-массовые и гидродинамические характеристики ПП тыквы

ПП	$N_{\underline{0}}$	$M_{\rm w} \cdot {\rm e}^{-3}$,	$M_{\rm w}/M_{\rm n}$	$M_z \cdot e^{-3}$,	[η],	Rh (w),	b*	ΑΓ,
1111	пика	КД	IVI_{W}/IVI_{n}	КД	мл/г	HM	D.	%
ТкП 85-60	1	673.90	1.93	2069.00	747.0	39.7	0.57	17.70
1 K11 83-00	2	72.02	1.20	82.99	251.0	13.2		
ТкП 120-3	1	661.00	1.80	1267.00	689.4	39.0	0.61	37.50
1 KII 120-3	2	65.71	1.15	74.29	162.4	11.2		
ТкП 120-5	1	769.50	3.40	3969.00	375.1	33.1	0.47	40.00
1 K11 120-3	2	58.58	1.20	69.01	125.8	10.0		
ТкП 120-7	1	622.10	1.86	1317.00	471.8	33.4	0.56	21.60
1 K11 120-7	2	62.61	1.28	77.84	153.3	10.9		
T H 120 10	1	403.50	1.56	619.40	492.4	33.1	0.50	34.95
ТкП 120-10	2	41.72	1.31	48.64	180.0	10.2		

^{*} Коэффициент, найденный из кривой зависимости гидродинамического радиуса и молекулярной массы, определяющий конформацию макромолекулы в растворе, рис. 3.8.

Основная фракция ПВ, около 31 %, полученная при 85^{0} С, имеет высокие значения средневесовой молекулярной массы ($M_{\rm w}$) 673.9 КД и z-средней молекулярной массы $M_{\rm z}$ (2069.0 КД), высокие значения вязкости ($[\eta]$), гидродинамического радиуса (Rh), найденного из характеристической вязкости. Вторая фракция составляет 59 %. Имеет низкую $M_{\rm w}$, $M_{\rm z}$ и Rh, но довольно высокое значение [η] по отношению к низкомолекулярной части ПВ тыквы, полученной флеш методом.

ПВ, экстрагированные при высокой температуре и давлении, имеют также высокие значения M_w , M_z и Rh, но относительно низкое значение [η], что указывает на агрегирующую способность ПВ, подвергнутую высокой температуре. Вначале процесса флэш экстракции (3 мин) высокомолекулярная и низкомолекулярная фракции, которых разделились на 48 и 52 % от ПВ, имеют значения молекулярной массы и показатель полидисперсности, приближенные к аналогичным показателям образцов, полученных при низкой температуре. В

то же время, наблюдается практически двукратное снижение показателя M_z . С увеличением продолжительности процесса быстрой экстракции изменение молекулярной массы обоих фракций ПВ тыквы носит экстремальный характер. При этом максимум приходится на 5 минут. Аналогичным образом изменяется показатель M_z и значение полидисперсности образцов.

Отношение высокомолекулярной к низкомолекулярной фракции в конце процесса достигается 24 и 75 % соответственно, что указывает на процесс деградации ПВ при быстром способе гидролиза, при высокой температуре и давлении.

Анализ полученных данных показывает, что распад ПП тыквы при различной продолжительности процесса протекает неравномерно. Появление максимумов в кинетике выхода МГ, изменение содержания звеньев ГК, АГ и молекулярно-массовые характеристики в области 5 минут свидетельствуют о том, что до данного времени протекает распад ПМ КС и экстракция нативных макромолекул протопектина. С дальнейшим увеличением продолжительности процесса, наряду с продолжающимся распадом ПМ, параллельно протекают процессы ассоциации и диссоциации высокомолекулярных субъединиц, АГ в растворе гидролизата с образованием низкомолекулярных фракций ПВ и ОС. Относительно высокие значения $[\eta]$ и Rh макромолекулы в низкомолекулярных фракциях указывают на переход от клубокообразной формы длинных молекул к линейной структуре, но с низкой M_w , M_z и Rh.

Величина коэффициента b, определяющего конформацию макромолекулы в растворе, найденная из наклона кривой зависимости гидродинамического радиуса и молекулярной массы, также имеет высокое значение для ПВ тыквы при любом методе получения, за исключением 5 минутной продолжительности быстрой экстракции. Найденные средние значения коэффициента b для смеси экстрагированных пектинов, указывают на конформацию случайных клубков с

вытянутой формой. Макромолекулы ПВ, полученные при 5 минутной экстракции, имеют компактную конформацию, ввиду их высокой агрегации, на что указывают высокие значения АГ и $\rm M_z$.

Однако, при разделении хроматограмм на два отдельных пика и расчета коэффициента b из конформационных кривых в отдельности, наблюдается четкое разделение ПВ на две фракции с различной конформацией цепи (рис. 3.8). Первая высокомолекулярная фракция имеет конформацию свернутого (сферического) клубка (b=0.29), а вторая представлена низкомолекулярными ПВ, имеющими жесткую конформацию цепи в виде линейных стержней (b=0.94).

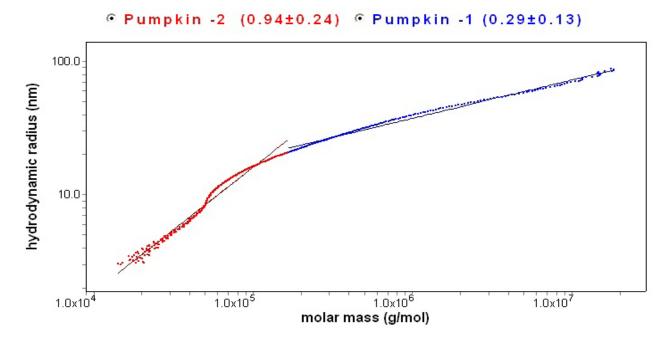


Рисунок 3.8. Зависимость гидродинамического радиуса от молекулярной массы фракции пектинов тыквы, полученные флеш методом (ТкП-120-5-2.0): первая, высокомолекулярная фракция, в интервале молекулярных масс 120 КД и более, Pumpkin-1 (b=0.29) и вторая, низкомолекулярная фракция, в интервале молекулярных масс 40-120 КД, Pumpkin -2 (b=0.94).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют перспективность использования плодов тыквы в качестве сырья для получения высокомолекулярных пектиновых полисахаридов. Относительно низкий выход ПВ с успехом компенсируется высокими значениями выхода МГ и ОС, востребованность которых, в качестве гелевых композитов и функциональных пищевых добавок, резко возросла в настоящее время. Изучение влияния продолжительности процесса быстрой экстракции на распад ПМ тыквы и параметры компонентов дают дополнительную информацию о строении макромолекулы ПП тыквы.

Полученные гидродинамические параметры ПП, а именно водорастворимой фракции ПВ хорошо согласуются с таковыми, найденными для ПП тыквы, полученных с помощью микроволновой экстракцией [17].

Данная работа демонстрирует уникальную структуру ПП тыквы, состоящей из ПВ, ПГ и МГ фракций, полученные флеш способом гидролиз-экстракцией, на основе результатов ЯМР ¹H, ¹³C и gHSQC спектроскопии, ИК-Фурье спектроскопии и результатов гидродинамических исследований.

Таким образом, на основе совместного анализа результатов данной работы и данными, имеющиеся в литературе, можно установить строение основных компонентов ПП, присутствующих в HG и RG-I регионах КС плодов тыквы.

Области RG-I были разветвленными с боковыми нейтральными олиго- и полисахаридами из 1,4-галактана и 1,3-арабинана в виде α -D-Galp- $(1 \rightarrow 3)$ - β -L-Arap- $(1 \rightarrow 4)$ - β -D-Galp прикреплен к HG или RG цепи. Необходима детальная работа для определения первичной и вторичной структуры пектина плодов тыквы. Молекулярная структура компонентов пектина из этого источника является чрезвычайно сложной. ММР ПП указывает на наличие двух типов макромолекулы отличающихся по форме и размеру: один имеет высокий, а

другой низкий молекулярный вес; обе фракции имеют узкие профили ММР. Эти фракции также отличаются по степени этерификации карбоксильных групп, с помощью метода НПВО на ИК-Фурье спектрометре определены СЭ фракции ПП: у ПВ она составляет 46-48 %, у МГ 9-11 %, а у ПГ около 2 %. Согласно данным ЯМР спектроскопии, карбоксильные группы у ПВ на 1/3 части ацилированы.

Данные результаты дают новую информацию о структуре и поведении ПП плодов тыквы, что даёт основу для развития технологии получения НМ-пектинов и пектиновых гелей. Показано, что с применением флэш метода, в целом, можно получить до 15-16 % ПП, и ОС, потенциальный источник пребиотиков и функциональных пищевых ингредиентов, необходимые для медицине, пищевой и фармацевтической промышленностей.

- 3.3. Физико-химические свойства и структурные особенности ПП подсолнечника, полученных последовательной экстракцией
- 3.3.1. Влияние способа экстракции на физико-химические и гидродинамические свойства ПП корзинок подсолнечника

ПП в зависимости от вида сырья и способа получения экстрагируются в виде различных полисахаридных фракций, проявляют различные физико-химические и гидродинамические свойства [71,75,105,142,140,149], которые определяют направление их применения.

В настоящей работе ПП были фракционно экстрагированы из корзинок подсолнечника различными реагентами для детального анализа структуры, молекулярной массы (M_w) , молекулярно-массового распределения (MMP) и гидродинамических свойств выделенных фракций.

Корзинки подсолнечника (урожай 2013 г.) измельчали на лабораторной мельнице (Retsch, Германия), отделяли фракции с размером частиц 0.2-0.3 мм.

ПП последовательно экстрагировали с помощью растворов NaCl, водой и HCl при соотношении сырьё : раствор - 1:10, температуре 60 и 85^{0} С соответственно. Остаток клеточной стенки отделяли фильтрованием через плотный лавсан и высушивали. Полученные фильтраты центрифугировали при 3500 об/мин в течение часа, осадок пектинового геля (ПГ) сушили при 55-60⁰ С. Полученные ПП фракции последовательно очищались спиртовым осаждением диаультрафильтрацией перед анализом. Олигосахариды (ОС) в данной работе оставались не характеризованными в спиртовом растворе или в виде фильтрата после диаультрафильтрации. Содержание ГК и СЭ карбоксильных групп, гидродинамические параметры, молекулярный вес и ММР определяли по методам, описанными в экспериментальной части.

Фракции ПП были получены в зависимости от их способности к растворению в различных средах, что привело к значительным отличиям физико-химических свойств и гидродинамического поведения данных биополимеров (табл. 3.8–3.10). Во время выделения ПП, полученных солевым и кислотным растворами, спиртом, осадок после центрифугирования разделился ещё на две субфракции, часть которых всплыла вверх, а другая часть осаждалась на дне центрифужной пробирки. Характеристики фракций, полученных пектинов приведены в таблицах (табл. 3.8 - 3.10).

Таблица 3.8 Физико-химические свойства пектиновых фракций, полученных из корзинок подсолнечника

фромунун ПП	B	ыход фракции I	ГК, %	СЭ, %		
фракции ПП	ПВ	МГ, % от ПВ	ПГ	OC	1 K, %	C <i>J</i> , 70
F1 (NaCl) верхняя часть	2.74	12.0	7.37	14.2	65.4	39.2
F1 (NaCl) нижняя часть	3.58	10.2	-	-	75.5	49.5
F2 (H ₂ O)	-	70.0	6.50	21.5	45.8	49.8
F3 (HCl) верхняя часть	1.02	2.2	8.28	6.54	69.2	44.8
F3 (HCl) нижняя часть	-	40.5	-	_	40.1	36.0

Солерастворимая фракция, полученная раствором NaCl, имела наибольший выход растворимого пектина - 6.32 %. Выход пектинового геля оказался высоким во всех фракциях: 7.37 % у первой фракции; вся водная фракция 6.50 и 8.28 % у нижней части фракции ПП, экстрагированной кислотой. Мы предполагаем, что эта фракция (ПГ) представляет собой полисахаридный матрикс с низкой СЭ, частично связанной с двухвалентными металлами, который после охлаждения раствора гидролизата выпадает в осадок. Однако, при повторном растворении он практически не растворяется.

Основными показателями качества ПП как биополимеров, кроме содержания основного компонента ПП ГК и СЭ, является молекулярная масса и ММР. Установлено, что ММР и СЭ пектинов регулируют их чувствительность и активность в комплексообразовании. Молекулярная масса и гидродинамические свойства пектиновых фракций корзинок подсолнечника, полученные методом МУЛС приведены в табл. 3.9.

Таблица 3.9 Молекулярная масса и гидродинамические свойства пектиновых фракций корзинок подсолнечника, полученные методом МУЛС

Фракции ПП	% Rec	$M_{\rm w}/M_{\rm n}$	М _w , КД	[η], мл/г	Rgz,	Rhz,	ρ=Rg/Rh	a
F1 (NaCl) нижняя часть	75.7	2.28	777	139.3	54.5	58.3	0.93	0.909
F1 (NaCl) верхняя часть	78.5	2.63	904	119.5	55.9	60.3	0.93	0.794
F2 (H ₂ O)	53.6	1.93	187	518.7	51.2	36.4	1.41	0.898
F3 (HCl) нижняя часть	58.5	2.09	238	509.2	47.9	39.0	1.23	0.695
F3 (HCl) верхняя часть	92.4	2.81	320	451.4	46.6	42.1	1.11	0.617

Так как содержание ГК пектиновых фракций полисахаридов, полученных солевым раствором и верхняя часть фракции, полученная кислотой, были

высокими, то эти фракции, возможно, составляют НG часть цепи ПП. Фракции, экстрагированные водой, и нижняя субфракция кислотой скорее состоят из гетерополисахаридов RG I и RG II. Анализ ЭЖХ данных позволяет сделать вывод о структуре и конформации выделенных фракций ПП подсолнечника.

Для примера на рис. 3.9 приведены, полученные хроматограммы солерастворимой фракции (верхней части) ПП.

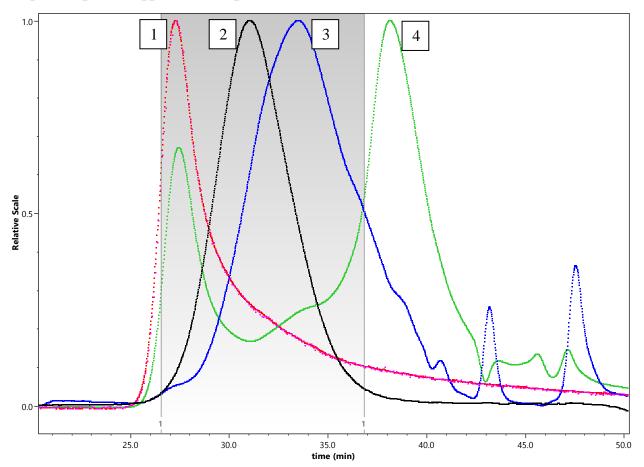


Рисунок 3.9. Хроматограммы фракции ПП подсолнечника, полученные с помощью солевого раствора. Хроматограммы соответствуют сигналам: МУЛС (1); визкозиметрического (2); рефрактометрического (3) и УФ (4) детекторов.

Они были почти одинаковые для нижней части данной фракции. Однако, хроматограммы ПП водной и кислотной фракций отличались по сигналу УФ

детектора, что говорит о присутствии белка и полифенолов, а также неодинаковых по строению компонентов, составляющих ПП.

На первый взгляд из профиля распределения хроматограмм (рис. 3.9) видно, что эти фракции мономодальные по MMP, отличаются как по составу, так и по конформации макромолекул.

Относительно высокое значение $M_{\rm w}$ и низкое значение характеристической вязкости солерастворимых фракций, найденные методом МУЛС, объясняется цепной агрегацией вытянутых макромолекул, что подтверждается найденным значением $M_{\rm w}$ методом универсальной калибровки с помощью визкозиметрического детектора (табл. 3.10).

Таблица 3.10 Молекулярная масса и гидродинамические свойства пектиновых фракций корзинок подсолнечника, полученные методом ЭЖХ с использованием универсальной калибровки

Пектиновые	%	$M_{\rm w}/M_{\rm n}$	M _w ,	[η],	M _z ,	Rhz,	b
полисахариды	Rec		КД	мл/г	КД	НМ	
F1 (NaCl) верхняя часть	111	1.57	126	104.5	173.1	55.9	0.60
F2 (H ₂ O)	64	3.729	540.6	630.4	3044.0	69.0	0.48
F2 (HCl) верхняя часть	106	4.485	493.0	301.7	2216.0	49.3	0.49

Отличие значений M_w , полученные методом ЭЖХ с использованием МУЛС и вискозиметрического детекторов, указывает на тенденцию пектинов к агрегации, что может привести к снижению значения M_w , например, для водорастворимой фракции. Обращает внимание процент выхода образцов (%Rec) из ЭЖХ колонок для данной фракции ПП. Столь низкое значение % Rec как в случаи с TSKgel (53.6 %), так и с PL-Aquagel колонок (64 %) однозначно свидетельствует об агрегирующих свойствах данных фракций. Это подтверждает количество МГ в этих фракциях.

Результаты М_w, ММР и гидродинамические характеристики фракций пектинов подсолнечника, полученные в различных средах, разными методами, представленные в табл. 3.9 и 3.10, свидетельствуют о наличии в ПП подсолнечника высокомолекулярных фрагментов HG, RG I и RG II с различным гидродинамическим поведением. Фракции солерастворимых ПП отличались высокой M_w, значением радиусов инерции (Rg) и гидродинамического радиуса (Rh), но имели низкое значение характеристической вязкости. Эти данные, наряду с содержанием ГК (табл. 3.8), подтверждают гипотезу о наличии НС области ПП фракций, экстрагированных раствором соли. Значения параметра уравнения Марка-Хаувинка (а) для солерастворимой фракции равнялись 0.909 и 0.794, соответственно, для нижней и верхней субфракций. Эти фракции имеют такую высокую плотность заряда, что ПП макромолекулы у них принимают форму вытянутых клубков, в то время как кислоторастворимые фракции ПП принимают слегка свернутую конформацию. Это подтверждается также значениями параметра (b), найденного из логарифмической зависимости визкозиметрического радиуса (Rh) от M_w (табл. 3.10). Несогласие в значениях M_w и [ŋ] также обусловлено гидродинамическим поведением макромолекул [127], связанное со степенью их компактности (уплотненность) и разветвленности макромолекул ПП. Другим количественным параметром, характеризирующим архитектуру полимеров, среднеквадратичных является отношение гидродинамических радиусов макромолекул (ρ=Rg/Rh), найденных методами статистического и динамического светорассеивания [150]. Показано, что с ростом степени разветвления макромолекулы значение р уменьшается. Найденные значения параметра р для фракции ПП подсолнечника указывают еще на разветвленность солерастворимой фракции, что также является причиной низкого значения характеристической вязкости и высокой M_w [39,97].

Таким образом, несмотря на гетерогенность строения ПП подсолнечника, они еще могут отличаться по форме, размеру и степени линейности макромолекул.

3.3.2. Влияние способа экстракции на структурные особенности ПП корзинок подсолнечника

В данной части работы, последовательно экстрагированые фракции ПП из корзинок подсолнечника с помощью соли, воды и кислоты были анализированы с использованием ¹H, ¹³C и двумерной gHSQC ЯМР спектроскопии. Как описано в работе [138] фракции пектина получали методом последовательной экстракции.

Спектры ¹H, ¹³C и gHSQC были сняты для пяти фракций ПП подсолнечника. В отличие от ЯМР спектров ПВ тыквы данные спектры были хорошего качества. В рамках данной работы обсуждаются ЯМР спектры и строение только солерастворимой фракции ПП. На рис. 3.10 и 3.11 приведены ¹H и ¹³C ЯМР спектры нижней и верхней частей солерастворимой фракции (F1).

В спектрах ¹Н протонов метильных групп обнаружены сигналы между 1 ~ 1.4 м.д., в то время протоны ацетильных групп проявились при 1.5 ~ 2.5 м.д. Интегрируя интенсивность сигнала в этих областях и сравнивая с оставшимися протонами сахарных остатков можно определить процентное содержание этих групп во фракциях ПП. Например, для нижней части фракции, представленной на рис. 3.10 интегрированная сумма сигналов протонов, кроме метильных и ацетильных групп составляет 1000, а относительная интенсивность метильных и ацетильных групп равна 37.44 и 28.77 соответственно. Так как эти группы имеют по 3 протона, а остальные протоны в сахарных остатках пектина представлены метиновыми группами (С-Н), то при расчетах учтен вклад интенсивности протонов других присутствующих сахарных остатков.

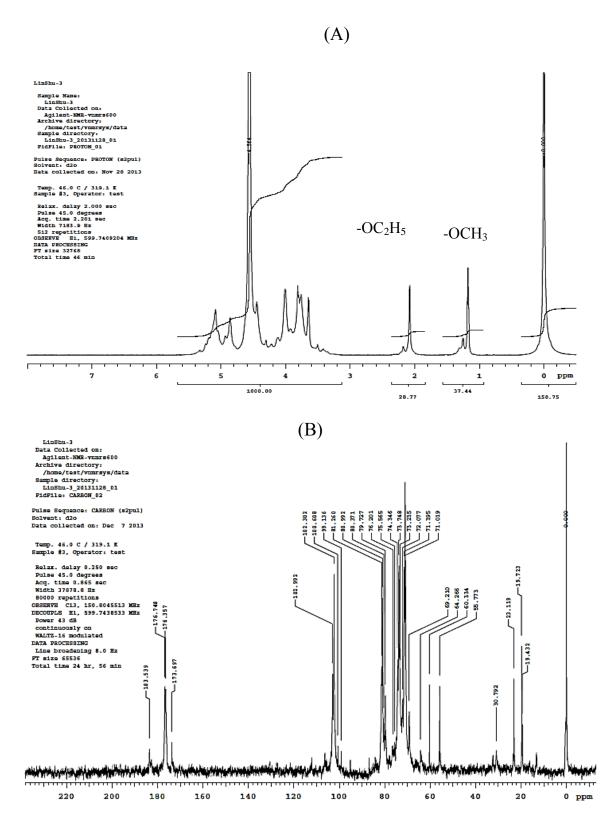
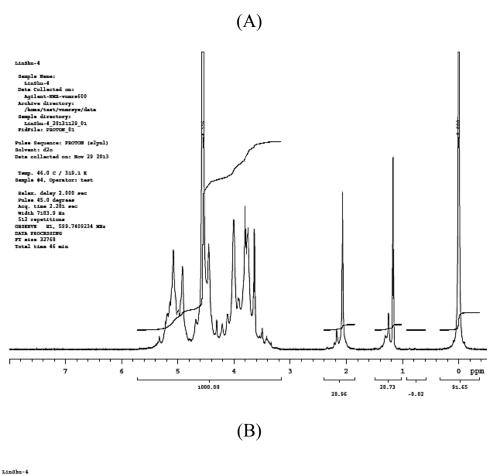


Рисунок 3.10. Спектры ЯМР 1 H (A) и 13 C (B) солерастворимой фракции ПП (F1-нижняя фракция).



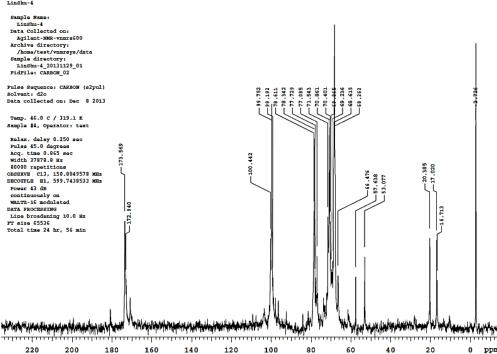


Рисунок 3.11. Спектры ЯМР 1 H (A) и 13 C (B) солерастворимой фракции ПП (F1-верхняя фракция).

Как видно из ¹H и ¹³C ЯМР спектров они отличаются как по сигналам протонов сахарных остатков, так и сигналам соответствующих углеродных атомов. Также четко видно, как резонансы карбоксильных групп ПП у данных фракций заметно отличаются (табл. 3.11). Эти отличия внутри одной фракции еще раз подтверждают гипотезу о разнообразии в форме и строении ПП в КС.

Наличие разнообразия в положении карбоксильных групп ПП в изученных солерастворимых фракциях доказывает резонанс между $170 \sim 185$ м.д. в ЯМР спектрах 13 С. В ЯМР 13 С спектрах нижней части обнаружены сигналы для карбоксильных групп при 173.7, 176.4, 176.7 и 183.5 м.д., а для верхней части фракции пектинов эти сигналы проявляются при 170.5, 172.9, 173.6 и 181.0 (табл. 3.11).

Таблица 3.11 Анализ солержания функциональных групп

	1 111 00 1113 0	одержания	фуницие	THE P.	, 1111	
Фракция ПП	Метильные группы, %	Количество сигналов метильных групп *	Ацетильные группы, %	Количество сигналов ацетильных групп *	Резонансы карбоксильных групп	Количество аномерных атомов в gHSQC*
F1 (NaCl) нижняя часть	1.17	4	0.90	3	173.7 176.4 176.7 183.5	10
F1 (NaCl) верхняя часть	0.91	4	0.91	3	170.5 172.9 173.6 181.0	10

^{*} Из — за отношения сигналов к шуму, количество резонансов даётся в приблизительных цифрах, для того чтобы оценить относительное количество углеводных остатков во фракциях пектиновых полисахаридов.

Другая важная информация, вытекающая из спектров ЯМР, является наличие разнообразия количества метильных групп во фракциях, показывающих влияние их окружения. В этом плане для анализа принимаются

во внимание только интенсивные пики, затем полученный результат сравнивается с количеством пиков в двумерных спектрах gHSQC. При сравнение ЯМР спектров ¹Н с диаграммами gHSQC эксперимента, для данной фракции, видно появление 4 резонансов для метильных и 3 резонанса для ацетильных групп одинаково в обеих фракциях, что говорит о присутствии минимум четырёх вариантов структур, где карбоксильные группы в пектине окружены различными группами.

Результаты количественного анализа изученных фракций пектинов методом ЯМР ¹ Н и ¹³С и gHSQC представлены в виде процентного содержания метильных, ацетильных и карбоксильных групп. В табл. 3.11 дается анализ содержания функциональных групп найденных из отношения:

$$q_x = I_x / I_{obm}. \tag{3.1}$$

Учитывая, что эти фракции отличаются по СЭ и M_w , можно предположить, что отличие в химических сдвигах для карбоксильных групп скорее являются следствием конформационно изменённого аналога макромолекул ПП, имеющих низкую СЭ. Данные параметры, в свою очередь, проявляются в процессе растворимости, гидратации и других физико-химических поведениях этих интересных макромолекул.

Анализ распределения углеродных атомов по различным типам в области углеродных резонансов 103–99 м.д. (аномерные атомы углеводов) и 81–71 м.д. (СНО- и $\rm CH_2O$ -фрагменты) спектра ЯМР $^{13}\rm C$ нижней части солерастворимой фракции ПП подсолнечника показывает, что данная фракция пектина содержит значительное количество углеводных фрагментов (рис. 3.11(A)).

Спектры gHSQC (рис 3.12) дают ясную картину наличия аномерных резонансов в макромолекуле ПП для солерастворимой фракции ПП подсолнечника. Этим методом (табл. 3.11) обнаружены по 10 аномерных пиков для верхней и нижней частей.

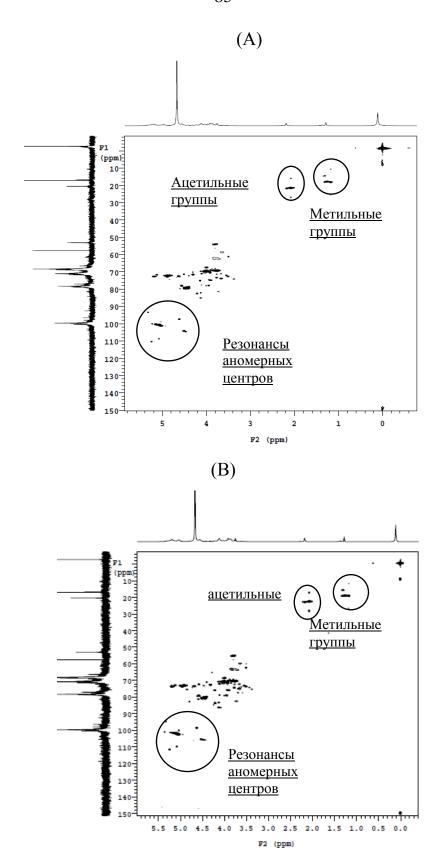


Рисунок 3.12. Спектры gHSQC нижней (A) и верхней (B) части солерастворимой фракции ПП подсолнечника.

анализа MP ^{1}H , ^{13}C и gHSQCТаким образом, из спектров солерастворимой фракции ПП становится ясно, что данная фракция представляет гетерополимер, образованный минимум из пяти сахарных остатков, в основе которых лежат цепи галактуроновых кислот, карбоксильные группы, которые этерифицированы метильными и ацетильными группами. С помощью количественного анализа ЯМР спектров определено процентное содержание этих групп во фракциях ПП. Наличие разнообразия в количестве найденных из спектров ЯМР изученных метильных групп, показывают влияние их окружения, появление 4 резонансов для метильных и 3 резонансов для ацетильных групп одинаково для обеих фракций, что свидетельствует о присутствии четырёх вариантов структур, где карбоксильные группы в пектине окружены различными группами. Спектры gHSQC показали наличие аномерных резонансов в макромолекуле данных фракций ПП. Для солерастворимых ПП подсолнечника этим методом обнаружено по 10 аномерных пиков для верхней и нижней частей фракции.

3.4. Мембранная очистка пектинового гидролизата

Совершенствование технологических процессов пищевого производства в условиях глобального экологического кризиса и сложного экономического положения в нашей стране особо остро стоит задача, для учёных, в направлении максимальной экономии и более полного использования сельскохозяйственного сырья и других природных ресурсов для выработки продуктов питания, содержащих различные функциональные добавки. Для решения этой задачи необходима разработка гибких технологических линий переработки растительного сырья, с соблюдением экологических требований современных производств.

В последние годы внимание ученых все более привлекает применение мембранных методов разделения и концентрирование жидких смесей: диализ,

электродиализ, обратный осмос, диа- и ультрафильтрация, которые обладают рядом преимуществ перед известными методами разделения как выпаривание, ионный обмен, вымораживание, дистилляция, сепарация и другие. Мембранные методы отличает конструктивная компактность аппаратуры, экономичность (малая энергоемкость), высокая эффективность разделения, экологическая чистота, простота в масштабировании производства. Относительная простота исполнения и автоматизация процесса позволяют значительно уменьшить расход тепла, электроэнергии и водных ресурсов.

Применение мембран в пищевом производстве позволяет не только создавать замкнутые, безотходные, экологически чистые производства, но и получать пищевые продукты с хорошими, ярко выраженными пищевыми и биологическими качествами [151]. Особенно это касается жидких пищевых продуктов, содержащих ценные термолабильные компоненты. К ним относят овощные и фруктовые соки, пектиновые экстракты, экстракты лекарственных Мембранная трав Т.Д. технология позволяет разделять, очищать, фракционировать и концентрировать биологические жидкости, без фазового перехода при минимальных энергетических затратах, что позволяет получение нативных веществ. Таким образом, применение в пищевой отрасли мембранных способствует методов комплексной переработке сохранению сырья, биологической ценности и улучшению качества конечных продуктов.

Для лечения раковых заболеваний пектин помимо тщательной очистки от всех загрязняющих веществ должен иметь молекулярную массу в переделах 10-35 КД, степень метоксилирования не более 10 %, очень низкую ацетильную составляющую, а рН 1 % раствора пектина должен быть равен 6.3 [151-154]. Подобный образец пектина достаточно просто получить из НМ-пектинов корзинок подсолнечника и плодов тыквы с сочетанием мембранных методов.

Одним из сложных и дорогостоящих процессов в производстве пектина является концентрирование и очистка пектиновых экстрактов. В связи с этим возникает задача разработки методов очистки и концентрирования пектиновых растворов с применением энергосберегающих технологий, исключающих применение химических реагентов и не нарушающих нативную структуру и свойства молекул пектина. Наиболее перспективным способом является сочетание концентрирования и очистки пектиновых растворов методом ДУФ [64-67]. Этот метод объединяет оба процесса в одном цикле, а также позволяет проводит процесс при комнатной температуре, что существенно сокращает энергозатраты при производстве пектина.

В процессе ультрафильтрации ПП производительность мембраны, со временем, может резко снизиться, что может быть вызвано несколькими причинами — концентрационной поляризацией, адсорбцией [54], а также агрегацией пектиновых макромолекул при концентрировании разбавленных растворов [105]. Основной вклад в формирование гель-слоя вносят пектиновые вещества, а также целлюлоза. Для регенерации мембран авторы [64] рекомендуют применять моющую композицию, содержащую ферментные препараты пектолитического и карбогидразного действий.

Данная работа предопределяет также и некоторые общие подходы, позволяющие разработать методы концентрирования и очистки в производстве пектина, а также улучшить качество и снизить себестоимость целевого продукта. ДУФ осуществлялась на двух типах полых волоконных мембранных устройствах: полисульфоновой АР-ПС 100-2.5 (Институт физико-органической химии Белорусской Академии Наук, Минск, Белоруссия) и полиамидной ВПУ 100-2.0 (Предприятие Химволокно, г. Мытищи, Российская Федерация). Процесс ДУФ проводили при температуре окружающей среды (25-27° С) и входящем давлении 0.7-1.0 атм. Раствор пектина в зависимости от исходного

объема концентрировали в 4-5 раз, до минимального объема 7-10 литров. Из каждого раствора гидролизата после концентрирования отбирали пробу 1.2 литра для расчета выхода пектина и определения его параметров: содержание ГК и СЭ карбоксильных групп, которые определяли по методам, описанными в работах [133,136]. Повторную ДУФ проводили разбавлением остатка раствора до 20-30 литров дистиллированной водой и снова концентрировали до минимального объема. Для диализа от низкомолекулярных олигосахаридов и смеси фенолов пробу фильтрата концентрировали до необходимого объёма концентрации и анализировали соответствующие компоненты на спектрофотометре и с помощью метода ГЖХ [97]. Основные параметры процесса ДУФ пектиновых растворов полученных из яблок и подсолнечника при различном режиме гидролиза приведены в табл. 3.12.

Таблица 3.12 Основные параметры процесса ДУФ пектиновых растворов, полученных из яблок и подсолнечника при различном режиме гидролиза

	Исх.			Производительность			СТЬ
Пектин	концентрация	Тип	P,	мембраны, л/м ² ч		I	
220111111	раст. пектина,	мембраны	атм	ДУ	Ф1	ДУ	Ф2
	%.			K=1.5	K=4.0	K=1.5	K=4.0
ЯП(Ф)100-7	0.32	ВПУ-100	1.0	31.30	15.79	23.25	13.95
ЯП(Ф)120-7	0.33	ВПУ-100	0.9	17.47	8.69	13.09	8.53
ЯП(Ф)130-5	0.18	АРПС-100	0.9	22.50	13.91	20.00	15.15
КП120-7	0.32	АРПС-100	1.0	45.71	29.09	31.64	12.68
КП120-7	0.49	ВПУ-100	0.9	83.18	56.25	71.80	39.13

Как видно, производительность мембран в начале процесса при концентрировании в 1.5 раза (K=1.5) составляет 31.30 л/м²ч, а в конце процесса уменьшается почти в 2 раза. При втором цикле ДУФ у обеих использованных мембран производительность восстанавливается до 76-85 %. На

производительность мембран влияет как концентрация пектина в растворе, так и степень его деградации, т.е. $M_{\rm w}$ (табл. 3.13), зависящая от времени и температуры гидролиза. По данным табл. 3.12 и 3.13, нам не удалось установить корреляцию производительности мембран от концентрации и $M_{\rm w}$.

Таблица 3.13. Молекулярные параметры исследуемых пектинов

Пектин	М _w , КД	M_w/M_n	М _z , КД	Rh, нм
ЯП(Ф) 85-60	106.0	14.5	456	11.0
ЯП(Ф)100-7	165.0	6.9	771	13.6
ЯП(Ф)120-7	105.0	9.8	893	9.0
ЯП(Ф)130-5	99.0	9.0	773	9.0
КП120-7 ПС	61.2	3.1	279	6.5
КП120-7	58.0	2.6	171	6.3

К примеру трудно было объяснить столь заметную разницу в производительности мембраны ВПУ-100 яблочных пектинов ЯП(Ф)100-7 и ЯП(Ф)120-7, при сравнении $M_{\rm w}$, концентрации и давлении. Однако, при сравнении значений z- средней молекулярной массы и гидродинамического радиуса данных пектинов, можно получить информацию о степени агрегации полисахаридов. Действительно, несмотря на низкую молекулярную массу пектин ЯП(Ф)120-7, по сравнению с пектином ЯП(Ф)100-7 имеет высокое значение M_z и меньший Rh радиус, что свидетельствует о склонности данного пектина к агрегации, которая значительно снижает производительность мембраны [147].

Основными параметрами в процессе ДУФ являются производительность и селективность выбранных мембран. Селективность выбранных мембран, нами была изучена в работе [66]. Производительность УФ мембраны ВПУ-100 представлена на рис 3.13.

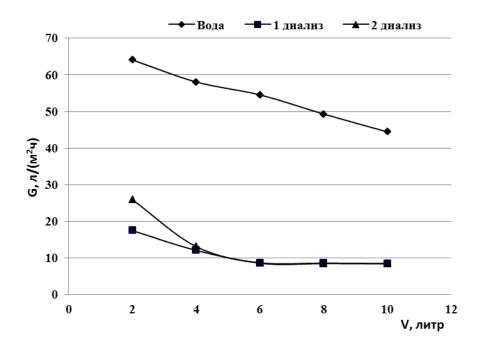


Рисунок 3.13. Производительность мембраны ВПУ-100 по раствору пектина и воды.

Изменение производительности УФ мембраны ВПУ-100 в процессе ДУФ представлена на рис. 3.13. Производительность мембраны по воде в начале процесса составляла 64.04 л/м 2 час и в течение процесса уменьшалась до 44.4л/м²час. Такая же картина наблюдается при ДУФ пектинового гидролизата. Производительность мембраны по ДУФ раствора пектина в начале первого цикла процесса достигала 17.47 л/м²час, и несколько увеличивалась при втором диализе. Среднее значение производительности процесса диаультрафильтрации составляла 8.5-8.7 л/м²ч. Эти данные хорошо согласуются лабораторной данными, полученными на установке ПО очистке концентрированию пектинового гидролизата [66].

В табл. 3.14 представлен выход фракций пектинов, содержание ГК, СЭ и количество балластных веществ в конечном продукте, в зависимости от процесса очистки и концентрирования исходных растворов гидролизата.

Таблица 3.14 Выход пектина и микрогеля, содержание галактуроновой кислоты, степени этерификации образцов пектина

Образии и науктина	Вых.	фракці	ии, %		СЭ,	Балласт.
Образцы пектина	МΓ	ПВ	OC	ГК, %	%	вещ-ва
ЯП(Ф)100-7-2.0- Спирт	2.26	22.37	31.87	50.4	68.60	12.00
ЯП(Ф)100-7-2.0- ВПУ-1д	2.26	18.69	44.55	64.8	81.40	5.80
ЯП(Ф)100-7-2.0- ВПУ-2д	2.26	14.23	47.01	67.2	82.56	3.20
ЯП(Ф)120-7-2.0- Спирт	1.52	25.63	31.69	52.8	68.60	11.20
ЯП(Ф)120-7-2.0- ВПУ-1д	1.52	14.33	49.99	69.6	76.47	3.80
ЯП(Ф)130-5-2.0- Спирт	1.15	26.83	31.82	57.6	69.77	10.80
ЯП(Ф)130-5-2.0- ПС-1д	1.15	14.43	51.22	68.4	78.16	5.60
ЯП(Ф)130-5-2.0- ПС-2д	1.15	12.80	51.85	73.2	76.74	2.80
КП120-7-2.0- Спирт	6.40	28.62	9.98	64.4	22.73	29.23
КП120-7-2.0- ВПУ 1д	6.12	10.32	28.36	81.6	26.19	5.40
КП120-7-2.0- ПС 1д	6.40	10.22	28.75	85.2	25.88	4.62

Если при спиртовом способе очистки выход пектина высокий, а содержание ГК в нем низкое, это говорит о низкой степени очистки конечного Также содержание балластных продукта. веществ, которые ухудшают потребительские свойства пектина, в пектиновых продуктах очищенных ДУФ в 3-6 раза уменьшается. Необходимо отметить, что при однократном ДУФ содержание ГК у яблочного пектина ЯП (Φ) -130-5-2.0 увеличивается от 57.6 до 68.4 %, а при двукратной диафильтрации достигает значения 73.2 %. В случае с подсолнечным пектином в процессе ультрафильтрации содержание ГК увеличилось от 64.4 до 81.6 % и 85.2 % соответственно, с использованием мембраны ВПУ и ПС. Однако выход пектина заметно уменьшается из-за высокого содержания балластных веществ В исследуемых материалах. Достаточно высокое содержание балластных веществ в данных объектах исследования объясняется большим количеством нейтральных полисахаридов и других низкомолекулярных компонентов клеточной стенки сырья, которые наряду с пектинами экстрагируются в процессе гидролиз - экстракции. Применение ДУФ в производстве пектина также приводит к увеличению молекулярной массы, уменьшению полидисперсности образцов и повышению чистоты конечного продукта.

Эксперименты на опытной установке четко показывают эффективность использования процесса ДУФ в производстве пектина, на что указывает расход спирта и энергии (табл. 3.15). Из данных табл. 3.15 видно, что количество этанола для получения концентрированного пектина методом ДУФ, по сравнение с вакуум - испарением по традиционной технологии, требуется в два раза меньше.

Таблица 3.15 Расход спирта и электроэнергии для получения 1 кг пектина традиционным способом и методом ДУФ

	Раствор	Конц.	Расход	Расхода
Пектины	гидролизата,	гилропизата граствор г		электроэнергии,
	Л	Л	этанола, л	кВт/ч
ЯП(Ф)100-7-2.0 Спирт	55.0	32.5	73.0	4.8
ЯПФ100-7-2.0-ВПУ	55.0	16.1	32.2	3.5
ЯПФ120-7-2.0-Спирт	27.6	19.6	54.6	4.5
ЯПФ120-7-2.0-ВПУ д 2	26.0	9.40	18.8	3.8
ЯПФ130-5-2.0-Спирт	28.6	21.0	56.3	4.5
ЯПФ130-5-2.0-ПС	26.2	12.3	24.6	3.2
КП120-7-2.0-Спирт	28.0	20.0	65.0	4.7
КП120-7-2.0-ВПУ	27.8	12.5	23.7	3.1
КП120-7-2.0-ПС	26.4	12.6	23.8	3.2

Кроме того, качество пектина в полученных образцах при использовании процессов ДУФ, по сравнению с традиционным способом значительно превосходит. В предложенном нами процессе, энергия расходуется только при гидролизе и работе насоса, в то время как в традиционном процессе значительное количество энергии требуется для концентрирования раствора гидролизата пектина в энергоемких - вакуум выпарных системах и длительного времени гидролиза.

Полученные данные также указывают на преимущество применения половолоконных мембран на основе полиамида, по сравнению с полисульфоновыми. При этом удается получить высококачественные ПВ со значительным сокращением затрат на производство пектина.

Проведённые опыты продемонстрировали преимущество применения ДУФ процесса в производстве пектина и особенности очистки и концентрирования яблочного и подсолнечного пектинов в данном процессе. Установлено, что применение ДУФ обусловливает внедрение при производстве пектина энергосберегающего технологического процесса для получения целевого продукта, отвечающего требуемому качеству и экологической безопасности производства.

3.5. Потребительские свойства пектиновых полисахаридов, полученные новыми способами

3.5.1. Желирующие свойства ПП

Известно, что гелеобразование высокомолекулярных соединений вызвано состоянием агрегации их молекул в растворе, когда цепные молекулы связанны друг с другом через функциональные группы ионными, водородными или дипольными связями, образуют непрерывную твердую фазу, сохраняя ту или иную степень сольватации под действием полярных атомов, а внутри своей структурной сетки могут содержать наибольшее количество раствора низкомолекулярных веществ.

Механизм гелеобразования ВМ- и НМ- пектинов отличается: ВМ пектины образуют гелевую структуру в присутствие сахаров и при низкой кислотности за счет водородных связей [155,156]; в то время НМ- пектины формируют структуру геля посредством ионов кальция [40,157] (рис. 3.14).

Пектины являются типичными гелеобразующими агентами, традиционно применяемые в варенье и желе, но также используются в других пищевых продуктах, таких как безалкогольные напитки и молочные продукты. Знание структурирующих свойств, в частности, температуры гелеобразования пектинов имеет существенное технологическое значение и таким образом точное определение температуры гелеобразования, т.е. «точка геля", при которой материальные свойства изменяются от жидкости - к более твердой, было Основой изучено течение нескольких десятилетий. механической характеристикой пектиновых гелей, как и чистых высокополимеров, является сочетание высокоэластической деформации с текучестью при напряжениях сдвига, превышающих предел упругости [158-160].

Несколько попыток было сделано, чтобы найти простой способ определения точки гель. Исследователи из [161] СР Кеlсо определили температуру гелеобразования через проводимость, другие использовали ЯМР спектры, [162] а также относительно простые визуальные тесты [163,164].

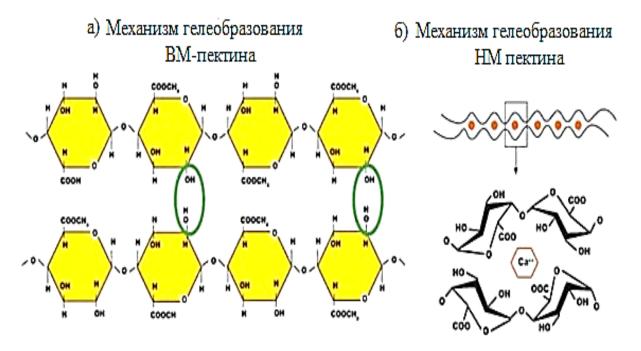


Рисунок 3.14. Механизмы гелеобразования: а) ВМ-пектина и б) НМ-пектина.

Процесс гелеобразования ПП довольно сложный, наиболее важные факторы, влияющие на прочность пектиновых гелей рН, концентрация Ca²⁺ и содержание растворимых сухих веществ (например, сахара) [163-168]. Одновалентные катионы, такие как натрий и калий, как полагают, связываются с пектинами только через электростатические взаимодействия и, следовательно, не вызывают образование структурированных гелей [169].

3.5.2. Факторы, влияющие на гелеобразование пектиновых полисахаридов

Для проведения исследований пектиновые экстракты были получены из корзинок подсолнечника (КП), апельсиновых корок (АП), стеблей и листьев ревеня (РП), айвовых (АйП), абрикосовых (АбП), персиковых (ПрП) и яблочных выжимок центральных (Варзоб – ЯП (В), Файзабад – ЯП (Ф) и южных регионов (Муминабад – ЯП (М)) Республики Таджикистан. Гидролиз проводился как в традиционном ($T=85^{\circ}$ C, pH 1.5-1.8 и при 60-120 мин) режиме, так и новым флеш способом в автоклаве при температуре 100-120° С, рН 2.0, варьируя продолжительность процесса для соответствующего сырья от 3-х до 10 мин [15,28]. Последующая очистка экстракта от механических загрязнений проводилась грубой фильтрацией и центрифугированием. Отфильтрованный раствор затем подвергался ДУФ с последующим концентрированием на одной и той же установке [146]. Сушка выделенных пектинов проводилась в термостате с продувом воздуха при температуре 40° С. Для сравнения студнеобразующей способности НМ-пектинов, полученных в данной работе, приведены также основные параметры коммерческого пектина марки LM12-CG компании CP Kelco США.

Желе для ВМ-пектинов готовили по стандартной методике. Значения прочности гелей (ПГ) пектиновых образцов, в присутствии сахаров и винной

кислоты (рН 3.2), были проверены методом Тарр-Бейкера (ТБ) на приборе (рис. 3.15), принцип работы которого приведен в [170].

Стандартным студнем, по Тарр-Бейкеру, считают студень, содержащий 65 % сахаров, оптимальное количество виной кислоты такое количество И пектина, чтобы прочность его на прибору разрыв ПО 50 соответствовала см столба четыреххлористого углерода. Число градусов ТБ показывает, какое количество сахара (в г) связывает 1 г данного пектина с образованием стандартного студня.

Авторами [164-167] было установлено, что степень

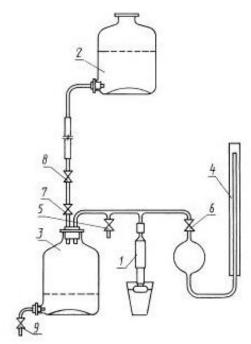


Рисунок 3.15. Прибор Тарр-Бейкер для определения прочности геля [170]: 1-стеклянный поршень; 2,3-склянки для воды; 4- шкала измерения давления (внутренний диаметр стеклянной трубки - 8 мм, диаметр шарообразной части - 70 мм); 5,9-вентиля.

замещения водорода у карбоксильных групп определяет характер взаимодействия в концентрированных растворах пектина. У ВМ-пектинов межмолекулярные взаимодействия происходят посредством водородных и гидрофобных связей, в то время как у НМ-пектинов, в основном, с участием водородных и поперечных связей ионами двухвалентных металлов.

Результаты исследований студнеобразования для различных ВМпектинов представлены в табл. 3.16. Образцы пектинов отличались по содержанию ГК, СЭ, молекулярной массе и гидродинамическим свойствам в растворе.

Таблица 3.16 Влияние способа очистки на основные параметры и прочность студня ВМ-пектинов

Пектины	ГК,	СЭ,	$M_w e^{-3}$,	$M_z e^{-3}$,	$\eta_{ m w,}$	Rh _{(w),}	ΠΓ,
ПСКІИНЫ	%	%	КД	КД	мл/г	HM	^{0}TE
ЯП (В)85-60-2.0С*	64.8	77.5	260.0	1305	335.0	20.2	215
ЯП(Ф)85 -60-2.0С	49.8	71.5	120.0	513	140.0	11.6	160
ЯП(Ф)120 -7-2.0М	64.8	81.4	118.0	899	161.2	11.9	169
ЯП(Ф)100 -7-2.0М	67.2	82.5	165.7	771	148.8	13.5	174
АП120-10-2.0 М	54.6	84.3	115.0	641	115.0	10.7	172
ПрП 85-60-2.0С	65.3	94.0	350.0	4975	420.0	22.3	190

^{*}Цифры после буквенных обозначений указывают: температуру, продолжительность времени и значение pH гидролиза; последняя буква в шифрах указывает на способ выделения и очистку пектина: С - спиртовое переосаждение; М - ультрафильтрация.

При оценке качества студней, приготовленных на их основе, следует учитывать, что ВМ-пектины отличались, кроме источника сырья, еще и способом гидролиза и очистки. Как видно, высокие показатели ПГ обнаружены у яблочного - ЯП (В), персикового, очищенного - ЯП (Ф)100-7 и апельсинового АП 120-10-2М пектинов, полученных новым способом. У яблочного пектина из Файзабадского района Республики Таджикистан уменьшение температуры гидролиза при их экстракции новым способом и очистке раствора гидролизата на ультрафильтрационной мембране, по сравнению с таким же пектином, полученным традиционным способом, привело к заметному возрастанию молекулярных гидродинамических параметров (M_w, η_w) $Rh_{(w)}$). способствовало возрастанию ПГ до значения 174⁰ ТБ. Результаты испытаний показали, что яблочный ВМ-пектин, полученный традиционным способом, и образец, экстрагированный гидролизом при температуре 120°C в течение 7 мин, студней не удовлетворяет требованиям, ПО показателю прочности предъявляемым к ним при использовании в пищевой промышленности.

Стандартная, с некоторыми модификациями, методика получения желе, была использована для определения влияния изученных параметров на

прочность желе НМ-пектинов. Предыдущий подход, также был применен для изучения влияния способа гидролиза и очистки на прочность студня НМ-пектинов.

С целью выявления влияния исходных характеристик НМ-пектинов на ПГ, при приготовлении студня по выше описанной методике нами были использованы ионы кальция, вместо винной кислоты при значении рН 4.0. Количество ионов кальция брали из расчета 25-40 мг на 1 г пектина, в области эквимолярных соотношений ионов кальция и карбоксильных групп, найденных для НМ - пектинов [165].

Как видно из табл. 3.17, наибольшее значение ПГ у цитрусового (LM12-CG, CP Kelco США) и яблочного пектинов ЯП (М) 120 из Муминабадского района Республики Таджикистан, экстрагированного и очищенного новым способом.

Таблица 3.17 Влияние способа очистки на основные параметры и прочность геля НМ- пектинов

П	ГК,	СЭ,	$M_w e^{-3}$,	$M_z e^{-3}$,	$\eta_{\mathrm{w},}$	Rh _{(w),}	ΠΓ,
Пектины	%	%	КД	КД	$_{ m MЛ}/\Gamma$	НМ	dT^0
КП85-60-1.5 С	74.0	26.6	49.2	154	29.5	5.4	125
КП120-7-2.0 М	76.0	32.0	58.0	181	34.5	6.3	167
LM 12-CG	69.0	35.0	136.0	596	180.0	14.0	192
РП-120-7-2.0 С	85.2	40.2	152.0	1633	182.0	14.2	168
ЯП(М)85-60-1.8	68.0	52.4	134.0	1133	148.6	13.3	172
ЯП(М)120-5 -2.0	73.5	53.7	199.0	5673	115.3	12.3	180
ЯП(М)120-10 -2.0 М	78.0	52.8	193.0	2820	132.0	12.1	183
АйП 85-60-2.0 С	66.0	58.2	188.0	12030	205.5	13.7	153

Студни из НМ-пектинов подсолнечника, ревеня и айвы не соответствовали значению прочности, необходимое для их стандартизации по

ГОСТу, хотя последние два пектина имели высокие значения средней молекулярной массы и гидродинамических параметров. На примере яблочного пектина показано, что использование инновационных способов - ускоренный гидролиз и последующая очистка образцов на мембране, позволяет получить пектин с высоким молекулярным весом и гидродинамическими свойствами, что значительно улучшает качество студня.

Несмотря на то, что разные образцы пектинов имеют стандартные параметры, у потребителей пектинов возникают трудности в оценке качества пектинов по содержанию ГК, СЭ и значения M_w. Однако, сравнительная оценка данных, представленных в табл. 3.16 и 3.17, позволила, нам, выявить четкую закономерность влияния молекулярной массы ИЛИ гидродинамических параметров как для ВМ-пектинов, так и для НМ-пектинов, выделенные из различных источников, на ПГ. Высокие значения молекулярной массы, характеристической вязкости и радиуса инерции пектинов могут значительно усилить $\Pi\Gamma$, в то время как значение M_z противоположно влияет на $\Pi\Gamma$. Для определения факторов влияющих на прочность студней, кроме вышеприведенных параметров, в табл. 3.18 приведено отношение M₇/M_w.

. Таблица 3.18 Влияние отношения M_z/M_w на прочность пектиновых гелей

Пектины	АГК,	СЭ,	$M_w e^{-3}$,	$M_z e^{-3}$,	$M_z/M_{w,}$	ΠΓ,
	%	%	КД	КД		$\mathrm{d}\mathrm{T}^0$
АйП 85 -60-2.0 С	66.0	58.2	188	12030	63.99	153
РП-120-7-2.0 С	85.2	40.2	152	2433	16.01	168
ЯП(М)85-60-1.8	68.0	52.4	134	2133	15.92	172
ЯП(М)120-5 -2.0	73.5	53.7	199	2673	13.43	180
ЯП(М)120-10 -2.0 М	78.0	52.8	193	2820	14.61	183
ПрП 85-60-2.0С	65.3	94.0	350	4975	14.21	190
LM 12-CG	69.0	35.0	136	596	4.38	192
ЯП (В)85-60 2.0С*	64.8	77.5	260	1305	5.02	215

Как видно, наблюдается закономерное повышение прочности студней с уменьшением M_z/M_w . Данный факт четко демонстрирует, что чем выше значение M_z , тем слабее прочность гелей, образованных обоими видами пектинов, независимо от значения M_w . Этим можно объяснить относительно слабое гелеобразование у пектина айвы, ревеня и персика, независимо от их молекулярного веса. Вполне вероятно, что склонность к агрегации этих пектинов может приводить к преждевременному гелеобразованию, что, в конечном итоге, нарушает целостную структуру геля, независимо от механизма их формирования.

Найдено [75], что значение M_z полимеров показывает степень агрегации макромолекулы. Из литературных данных известно, что пектины, даже в разбавленных растворах, образуют агрегаты посредством водородных связей [105-108]. Ранее, нами, было показано [106], что пектиновые макромолекулы, особенно НМ-пектины, могут находиться в агрегированном состоянии при высоких температурах. Вышеприведенный аргумент хорошо согласуется со свойствами студней пектинов, выделенных из айвы и ревеня с высоким значением M_w , не способны к образованию прочных студней, по сравнению с пектинами из яблок и цитруса, с относительно низким значением M_w .

Таким образом, представленные данные продемонстрировали эффективность использования новых технологий в производстве пектина, т.е. ускоренную диаультрафильтрационную экстракцию И очистку, способствующих получению пектинов с высокими желеобразующими свойствами. Важно отметить, что при оценке качества студней - необходимо принимать во внимание также отношение M_z/M_w, указывающего на степень агрегации молекул, препятствующей формированию студней независимо от природы пектина.

ВЫВОДЫ

- 1. Исследована применимость новой технологии получения пектина при высокой температуре и давлении (флэш способ) за короткий период гидролиза и диаультрафильтрации для эффективной очистки пектиновых полисахаридов различного вида сырья. Изучены физико-химические, гидродинамические потребительские свойства И пектиновых полисахаридов корзинок подсолнечника плодов ИЗ И тыквы установлены их структуры с использованием ИК- и ЯМР-спектроскопии.
- 2. Пектиновые полисахариды были фракционно экстрагированы из корзинок подсолнечника различными реагентами. Анализ физико-химических и гидродинамических свойств, выделенных фракций показал, что эти фракции мономодальные по молекулярно-массовому распределению отличаются как по составу, так и по конформации макромолекул.
- 3. Исследованы структурные особенности пектиновых полисахаридов из ПЛОДОВ использованием ИК-Фурье подсолнечника тыквы c 1 H-, 13 C- и двумерной gHSQC ЯМР спектроскопии. спектроскопии, Показано, что пектиновые полисахариды ИЗ данных источников представляют гетерополимер, образованный минимум из 5 сахарных остатков. Во фракциях обнаружено наличие 4 вариантов структуры, где карбоксильные группы окружены различными группами.
- 4. Отличие значений молекулярной массы, найденных методом эксклюзионной жидкостной хроматографии с использованием многоуглового лазерного светорассеивания и вискозиметрического детектора, указывает на тенденцию пектинов к агрегации, что может привести к снижению величины M_w и увеличению M_z .
- 5. Определены значения параметров (a) и (b), найденных из логарифмической зависимости характеристической вязкости [η]

- визкозиметрического радиуса (Rh) от M_w , установлены формы и размеры макромолекул пектиновых полисахаридов изученных объектов.
- 6. Выявлена эффективность использования ускоренной экстракции и диаультрафильтрационной очистки в технологическом процессе производства пектина, способствующих получению продуктов с высокими желеобразующими свойствами.
- 7. Путем систематического анализа значений M_z найдена взаимосвязь степени агрегации молекул и отношения M_z/M_w , позволившая впервые установить факторы, влияющие на прочность студней.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ara – арабиноза

Gal – галактоза

Мап – манноза

 M_w – молекулярная масса

RG I – рамногалактуронан 1

RG II – рамногалактуронан 2

Xyl – ксилоза

ВМ – высокометилированный

ГК – галактуроновая кислота

 $ДУ\Phi$ — диаультрафильтрация

КП – подсолнечный пектин

КСР – клеточная стенка растений

МГ – микрогель

ММР – молекулярно-массовое распределение

НМ – низкометилированный

ОС – олигосахариды

ПВ – пектиновые вещества

ПП – пектиновые полисахариды

ПМ - полисахаридноый матрикс

СЭ – степень этерификации

ТМ – традиционный метод

 $У\Phi$ — ультрафильтрация

ЦП – цитрусовый пектин

ЭЖХ – эксклюзионно-жидкостная хроматография

ЯП – яблочный пектин

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Food Hydrocolloid Market 2010. IMR International // www.hydrocolloid.com
- 2. Мухидинов, З.К. Пектин лечебно-профилактический продукт для здоровых и больных. Обзорная информация / З.К. Мухидинов, Д.Х. Халиков. Душанбе: НПИ Центр, 2005. 60 с.
- 3. Бобокалонов, Д.Т. Применение пектинов в медицине и фармации / Д.Т. Бобокалонов, З.К. Мухидинов, С.Д. Исупов и др. // Вестник Академии медицинских наук Таджикистана. 2013. Т. 8. № 4. С. 39-52.
- Kohn, R. Tibensky V. Exchange of calcium, strontium and barium ions on pectin / R. Kohn, V. Tibensky // Coll. Czech. Chem. Commun. 1971. № 36. P. 92-100.
- Sriamornsak, P. Chemistry of Pectin and its Pharmaceutical Uses: A Review / P. Sriamornsak // Silpakorn University International Journal. – 2003. - № 3. - P. 206–228.
- 6. Ou, S. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose / S. Ou, K. Kwok, Y. Li et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. № 49. P. 1026.
- 7. Venn, B.J. Glycemic index and glycemic load: measurement issues and their effect on diet-disease relationships / B.J. Venn, T.J. Green // European Journal of Clinical Nutrition. 2007. № 61. P. 122-131.
- 8. BeMiller, J.N. Acid-catalysed hydrolysis of glycosides / J.N. BeMiller // Advanced in Carbohydrate Chemistry. 1967. № 22. P. 25–91.
- 9. Пат. 2265612 Российская Федерация, МПК 6А 23 L 1/0524 Способ Шаззо Р.И. / Богус A.M. Квасенков; производства пектина патентообладатель Краснодарский научно-исследовательский институт переработки сельскохозяйственной хранения И продукции

- (государственное научное учреждение). № 2265612; заяв. 24.02.2004; опубл. 10.12.2005.
- 10. U.S. Patent 6143337 Extraction of pectin by microwave heating under pressure. Fishman M.L. Chau Hoa K. April 30. 1999.
- 11. Ptitchkina, N. Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes / N.M. Ptitchkina, O.A. Markina, G.N. Rumyantseva // Food Hydrocolloid. 2008. № 22. P. 192.
- 12. Matora, A.V. The application of bacterial enzymes for extraction of pectin from pumpkin and sugar beet / A.V. Matora, V.E. Korshunova, O.G. Shkodina // Food Hydrocolloids. 1995. № 9. P. 43–46.
- 13. Panouillé, M. Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts / M. Panouillé, J. F. Thibault, E. Bonnin // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. № 54. P. 8926–8935.
- Патент ТЈ 290, Способ получения пектина из растительного сырья / З.К. Мухидинов, Р.М. Горшкова, С. Халикова и др. 2010, НПИ Центр Республика Таджикистан, бюл. № 57 (1), 2009.
- Патент ТЈ 563, Флеш способ экстракции пектина из растительного сырья Мухидинов З.К., Тешаев Х.И., Джонмуродов А.С. и др. НПИ Центр Республика Таджикистан, бюл. № 86, 2013.
- 16. Wang, X. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water / X. Wang, Q. Chen, X. Lu // Food Hydrocolloids. 2014. № 38. P. 129-137.
- 17. Yoo, S.H. Structural Characteristics of Pumpkin Pectin Extracted by Microwave Heating / S.H. Yoo, B.H. Lee, H. Lee et al. // Journal of Food Science. 2012. V. 11. № 77. P. 1169.

- 18. Jun, H.I. Characterization of the pectic polysaccharides from pumpkin peel / H.I. Jun, C.H. Lee, G.S. Song et al. // LWT Food Science Technology. 2006.
 № 39. P. 554.
- 19. De Escaladpla, M.F. Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (Cucurbita moschata Duch ex Poiret) / M.F. De Escaladpla, N.M. Ponce, C.A. Stortz et al. // LWT-Food Science Technology. 2007. № 40. P. 1176.
- 20. Fissore, E.N. Rheological properties of pectin-enriched products isolated from butternut (Cucurbita moschata uch ex Poiret) / E.N. Fissore, L. Matkovic, E. Wider et al. // LWT-Food Science Technology. − 2009. № 42. P. 1413.
- 21. Renard, C. M. G. C. Studies on apple protopectin V: structural studies on enzymically extracted pectins / C. M. Renard, A. G. Voragen, J. F, Thibault et al. // Carbohydrat Polymers. 1991. № 6. P. 137-54.
- 22. Renard, C. M. G. C. Comparison between enzymatically and chemically extracted pectins from apple cell walls. Renard C. M. G. C., Voragen A. G. J., Thibault J. F. et al. Animal Feed Sci. Technol. − 1991. № 32. P. 69-75.
- 23. Renard, C. M. G. C. Studies on apple protopectin I: extraction of insoluble pectin by chemical means / C. M. G. C. Renard, A. G. J. Voragen, J. Thibault et al. // Carbohydr. Polym. − 1990. № 12. P. 9-25.
- 24. Kim, W.J. Formulation and characteristics of low-ester gels from sunflower pectin / W.J. Kim, F. Sosulski, S.J. Campbell // Journal of Food Science. 1978. № 43. P. 746-749.
- 25. Chang, K.C. Sunflower head residue pectin extraction as affected by physical conditions / K.C. Chang, N. Dhuranhar, X. You et al. // Journal of Food Science. 1994. V. 6. № 59. P. 1207-1210.

- 26. O'Beirine, D. Two distinct pectin fraction from senescent idared apples extracted using non-degradative methods / D. O'Beirine, J.P. Van Bure, L.R Mattick // Journal of Food Science. 1982. V. 1. № 47. P. 173-176.
- 27. Халиков Д.Х. Некоторые кинетические особенности гидролиза протопектина / Д.Х. Халиков, З.К. Мухидинов, М.Г. Асоев и др. // Химия природных соединений. 1994. № 6. С. 787-793.
- 28. Халиков, Д.Х. Физико-химические основы распада протопектина растительных клеток под действием кислотных катализаторов / Д.Х. Халиков, З.К. Мухидинов // Химия природных соединений. 2004. № 2. С. 89-100.
- 29. Карпович, Н.С. Пектин: Производство и применение / Н.С. Карпович, Л.В. Донченко, В.В. Нелина и др. Киев: Урожай. 1989. 88 с.
- 30. Мухидинов З.К. Физико-химические аспекты получения и применения пектиновых полисахаридов: дис. ... д-ра хим. наук: 02.00.06 / Мухидинов Зайниддин Камарович. Душанбе, 2003. 288 с.
- 31. Мухидинов, З.К. Новые технологические процессы в производстве пектина. Materiály VII mezinárodní vědecko praktická konference «Vědecký pokroknapřelomutysyachalety 2011» / З.К. Мухидинов, А.С. Джонмуродов, А.С. Насриддинов и др. // Díl 18. Lékařství. Praha: Publishing House «Education and Science» s.r.o 88 s.
- 32. Патент ТЈ № 197, Способ очистки пектинового гидролизата и получения пектинового геля. Мухидинов З.К. 14.11.98, бюллетен №3 (11).
- 33. Патент EA 016871, Способ получения пектина из подсолнечника. Мухидинов З.К., Фишман М.Л., Лиу Л.Ш. EA Patent 016871, заяв. 5 июня 2009, опубл. 30 августа 2012 г.
- 34. Oechslin, R. Pectin substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterization of a new type of rhamnogalacturonan I / R. Oechslin, M.V.

- Lutz, R. Amado // Carbohydrate Polymers. 2003. V. 3. № 51. P. 301-310.
- 35. Iwai, H. Absence of arabinan in the side chains of pectic polysaccharides strongly associated with cell walls of Nicotiana plumbaginifolla non-organogenic callus with loosely attached constituent cells / H. Iwai, T. Ishii, S. Satoh // Planta. 2001. V. 6. № 213. P. 907-915.
- 36. Yapo, B.M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts / B.M. Yapo, C. Robert, I. Etienne et al. // Food Chemistry. 2007. № 100. P. 1356–1364.
- 37. Yapo, B.M. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II / B.M. Yapo, P. Lerouge, J.F. Thibault et al. // Carbohydrate Polymers. 2007. № 69. P. 426–435.
- 38. Hwang, J. Comparison of dialysis and metal precipitation effects on apple pectins / J. Hwang, T.H. Roshdy, M. Kontominas et al. // Journal of Food Science. 1992. V. 5. № 57. P. 1180–1184.
- 39. Mukhidinov, Z.K. Some anomalous phenomena in hydrodinamic properties of pectin: Proceeding of the International Seminar on Polymer Science and Technology / Z.K. Mukhidinov, D.Kh. Khalikov, M.G. Asoev et al. // I.R. Iran, Tehran. 1997. V. 1. P. 213 220.
- 40. May, C.D. Industrial pectins-sources, production and application. Carbohydrate Polymers. 1990. V. 1. № 12 P. 79-99.
- 41. Rolin, C. Commercial pectin preparation. In G.B. Seymour, J.P. Knox (Eds) // Pectin and Their Manipulation. Oxford: Blacwell Publishing. 2002. P. 221-241.

- 42. Pagán, J. Quality of industrial pectin extracted from peach pomace at different pH and temperatures / J. Pagán, A. Ibarz, M. Llorca et al. // Journal of the Science of Food and Agriculture. − 1999. № 79. P. 1038–1042.
- 43. Garna, H. Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol / H. Garna, N. Mabon, C. Robert et al. // Journal of Food Science. − 2007. − V. 1. № 72. P. 1–9.
- 44. Мухидинов, З.К. Химическая неоднородность пектиновых макромолекул /
 3.К. Мухидинов, Х.Х. Авлоев, Ф.Т. Абдусамиев // Вестник Тадж.
 Госуниверситета. 1998. Серия естественных наук, № 6. С. 3-5.
- 45. Mukhiddinov, Z.K. Isolation and structural characterization of a pectin homo and rhamnogalacturonan / Z.K. Mukhiddinov, D.Kh. Khalikov, F.T. Abdusamiev et al. // TALANTA. The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry. 2000. V. 53. P. 171-176.
- 46. Yapo, B.M. Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature / B.M. Yapo // Journal of Agriculture and Food Chemistry. − 2009. № 57. P. 1572–1578.
- 47. Pilnik, W. Pectin a many splendoured thing, in: G.O. Phillips P.A. Williams D.J. Wedlock (Eds.) / W. Pilnik // Gums and Stabilizers for the Food Industry. Oxford University Press. 1990. P. 313-326.
- 48. Ашубаева, З.Д. Аннотированный библиографический указатель / З.Д. Ашубаева Фрунзе. -1989. Т. 2. С.4-135.
- 49. Kirchev, N. Pectin extraction in the presence of alcohols / N. Kirchev, I. Panchev, Ch. Kratchanov // Carbohydr. Polym. 1989. -V. 22. P. 257-263.
- 50. Bosac, F. Poster w technologi produkcii pektyny wysoko I niskometylowaney Przemyst Fermentacyjny I owocowo / F. Bosac, F. Stec, J. Furman Warzywny. 1982. № 6. P. 17-21.

- 51. Leroux, J. Emulsion stabilizing properties of pectin / J. Leroux, V. Langendorff, G. Schick et al. // J. Food Hydrocolloids. 2003. V. 17. № 4. P. 455.
- 52. Munarin, F. Advances in biomedical applications of pectin gels / F. Munarin, M.C. Tanzi, P. Petrini // International Journal of Biological Macromolecules. 2012. № 51. P. 681.
- 53. Mishra, R. R. Pectin based formulations for biomedical applications: a review / R. R. Mishra, A. K. Manthia, A. B. Majeed // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2012. V. 5. № 4. P. 1-7.
- 54. Мулдер, М. Введение в мембранную технологию: Пер. с англ. / М. Мулдер. М.: Мир, 1999. 13 с.
- 55. Giorno, L. Study of fouling phenomena in apple juice clarification by enzyme membrane reactor / L. Giorno, L. Donato, S. Todisco et al. // Separ. Sci. Technol. 1998. V. 5. № 33. P. 739-756.
- 56. Pat. 7834063 Fr. A23L2/30. Procede pour la clarification des jus de pomnesetanalgues avec recuperation de concentres de pectin. Verniers Clsude, Vrignaud Yves. N 2443216. Appl. 4.12.78; Publ. 4.07.80.
- 57. Pat. DE 3041096 A1, B 01 D 31/00. Verfahren zur Reiningung einer Pectin enthaltenden Flussigkeit. Fujii M., Kawamura S., Takano M., Minamata K. Appl. 31 okt.1980; publ. 16 June 1982; German Offen. 19 p.
- 58. Pat. BE 889950 (Belg.), C1 A23L. Clear Vegetable juices and recovery of the valuable constituents. Y. Virignaud Yves. Fr. 8017805; Appl. 13.08.80; Publ. 01.12.81.
- 59. Голубев, В.Н. Мембранное концентрирование жидких пищевых сред / В.Н. Голубев, Ю.Г. Гаджиев, П.С. Кавтарадзе и др. // Пищевая промышленность. 1992. № 2. С. 12.

- 60. Голубев, В.Н. Мембранная обработка экстрактов свекловичного пектина / В.Н. Голубев, С.Н Бондарь // Пищевая пром-сть. 1992. № 1. С. 27-28.
- 61. Szaniawski, A.R. Effects of immobilized pectinase on the microfiltration of dilute pectin solutions by macroporous titania membranes: resistance model interpretation / A.R. Szaniawski, H.G. Spencer // Journal of Membrane Science. 1997. V. 127. № 1. P. 69–76.
- 62. Поворов, А.А. Способ концентрирования пектиновых экстрактов методом ультрафильтрации. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции «Мембраны 98» / А.А. Поворов, Л.В. Ерохина, Н.А. Шиненкова. Москва. 1998. С. 161.
- 63. Голубев, В.Н. Пектин: химия, технология, применение / В.Н. Голубев. Н.П. Шелухина. - М.: Изд. Акад. Технолог. Наук. – 1995. - 387 с.
- 64. Горячий, Н.В. О природе загрязнений мембран в процессе концентрирования пектиновых экстрактов. Критические технологии / Н.В. Горячий, А.А. Свитцов, М.М. Марданян и др. // Мембраны. 2002. Т. 18. № 2. С. 40-44.
- 65. Muhidinov, Z.K. Stepwise dia-ultrafiltration system in the processing of pectin by products. Proceeding of CRE XI-Green Chemical Reactor Engineering Conferences, August 26-31 / Z.K. Muhidinov, J.T. Bobokalonov, M.A. Akhmedov et al. // Spain. Bilbao. 2007. P. 93.
- 66. Мухидинов, З.К. Диаультрафильтрационная концентрирование и очистка пектиновых полисахаридов / З.К. Мухидинов, Р.М. Горшкова, А.С. Джонмуродов и др. // Изв. Вузов. Химия и хим. Технология. 2011. Т. 54. вып. 2. С. 121-125.
- 67. U.S. Patent № 6,423,230. Ilias S., Hargrove S.C., Talbert M. "Method for Improving the Permeate Flux of a Crossflow Membrane Filter," U.S. Patent № 6,423,230. 2002.

- 68. O'Neill, M.A. The plant cell wall, annual plant reviews. Ed. Rose J.K.C. / M.A. O'Neill, W.S. York Oxford: Blackwell Publ. CRC. 2003. V. 8. P. 1–54.
- 69. Morris, V. J. Using AFM and force spectroscopy to determine pectin structure and (bio) functionality / V. J. Morris, A. Gromer, A.R. Kirby et al. // Food Hydrocolloids. 2011. V. 25. P. 230–237.
- 70. Liu, L. Pectin in controlled drug delivery a review / L. Liu, M.L. Fishman, K.B. Hicks // Cellulose. 2006. V. 1. № 14. P. 15–24.
- 71. Burton, R.A. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls / R.A. Burton, M.J. Gidley, B. Fincher // Mature Chemical Biology. 2010. V. 10. № 6. P. 724-732.
- 72. Günl, M. Oligo mass profiling (OLIMP) of extracellular polysaccharides / M. Günl, S. Gille, M. Pauly // J. Vis. Exp. 40, published online, doi: 10.3791/2046.
 20 June 2010.
- 73. Moller, I. High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles / I. Moller, S. E. Marcus, A. Haeger et al. // Glycoconjugate Journal. 2008. V. 25. № 1. P. 37–48.
- 74. Pattathil, S. A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies / S. Pattathil, U. Avci, D. Baldwin et al. / Plant Physiol. 2010. № 153. P. 514–525.
- 75. Muhidinov, Z.K. Physico-chemical characterization of pectic polysaccharides from various sources obtained by steam assisted flash extraction (SAFE) / Z.K. Muhidinov, Kh.I. Teshaev, A.S. Dzhonmurodov et al. // Macromol. Symp. 2012. V. 317 № 318. P. 142-148.
- 76. Round, A.N. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy / A.N. Round, N.M. Rigby, A.J. MacDougall et al. // Carbohydr. Res. 2010. № 345. P. 487–497.

- 77. Gierlinger, N. Cellulose microfibril orientation of Picea abies and its variability at the micron-level determined by Raman imaging / N. Gierlinger, S. Luss, C. König et al. // J. Exp. Bot. − 2010. − № 61. P. 587–595.
- 78. Paredez, A.R. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules / A.R. Paredez, C.R. Somerville, D.W. Ehrhardt // Science. 2006. № 312. P. 1491–1495.
- 79. Verhertbruggen, Y. Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls / Y. Verhertbruggen, S.E. Marcus, A. Haeger et al. // Plant J. 2009. № 59. P. 413–425.
- 80. Jones, L. A conserved functional role of pectic polymers in stomatal guard cells from a range of plant species / L. Jones, J.L. Milne, D. Ashford et al. // Planta 2005. № 221. P. 255–264.
- 81. Carpita, N.C. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth / N.C. Carpita, D.M. Gibeaut // Plant J. − 1993. № 3. P. 1–30.
- 82. Reid, J.S.G. Enzyme specificity in galactomannan biosynthesis / J.S.G. Reid, M. Edwards, M.J. Gidley et al. // Planta. 1995. № 195. P. 489–495.
- 83. Mohnen, D. Pectin structure and biosynthesis / D. Mohnen // Opin. Plant Biol. 2008. № 11. P. 266–277.
- 84. Doblin, M.S. Plant cell walls: the skeleton of the plant world / M.S. Doblin, F. Pettolino, A. Bacic // Funct. Plant Biol. 2010. № 37. P. 357–381.
- 85. Redgewell, R. G. Structural features of cell-wall polysaccharides of onion Allium-Cepa / R. G. Redgewell, R. R. Selvendran // Carbohydrate Research. 1986. № 157. P. 183–199.
- 86. Fishman, M.L. Global Structures of High Methoxyl Pectin from Solution and in Gels / M.L. Fishman, P.H. Cooke, H.K. Chau et al. // Biomacromol. 2007. № 8. P. 573-578.

- 87. Round, A. N. Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis / A. N. Round, N. M. Rigby, A. J. MacDougall et al. // Carbohydrate Research. − 2001. № 331. P. 337–342.
- 88. Grant, G. T. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations egg-box model / G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees et al. // FEBS Letters. 1973. № 32. P. 195–198.
- 89. Li, L. Re-examining the eggbox model in calcium—alginate gels with X-ray diffraction / L. Li, Y. Fang, Y. Vreeker et al. // Biomacromolecules. − 2007. № 8. P. 464–468.
- Morris, V. J. Gelation of polysaccharides. In S. E. Hill, D. A. Ledward, J. R. Mitchell (Eds.) / V. J. Morris // Functional properties of food macromolecules.
 1998. P. 143–170.
- 91. Morris, E. R. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerization process in alginate gelation / E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom et al. // Carbohydrate Research. − 1978. № 66. P. 145–154.
- 92. MacDougall, A. J. Calcium gelation of pectic polysaccharides isolated from unripe tomato fruit / A. J. MacDougall, P. W. Needs, N. M. Rigby et al. // Carbohydrate Research. 1996. № 293. P. 235–249.
- 93. Perez, S. Complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function / S. Perez, M. A Rodriguez-Carvajal, T. A. Doco // Biochimie. 2003. V. 85. № 2. P. 109-121.
- 94. Renard, C. M. G. C. Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins / C. M. G. C. Renard, M. J. Crepeau, J. F. Thibault // Carbohydrate Research. 1995. V. 275. № 1. P. 155-165.
- Willats, W. G. T. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel / W. G. T. Willats, J. P. Knox, J. D. Mikkelsen // Trends in Food Science and Technology. 2006. V. 17. № 3. P. 97-104.

- 96. Thakur, B. R. Chemistry and uses of pectin A Review / B. R. Thakur, R. K. Singh, A. V. Handa // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1997. V. 37. № 1. P. 47-73.
- 97. Мухидинов, З.К. Моносахаридный состав и гидродинамические свойства прмышленных пектиновых веществ / З.К. Мухидинов, Д.Х. Халиков, В.А. Дегтярев // Химия природных соединений. 1990. № 4. С. 455-460.
- 98. Constenlda, D. Effect of pomace drying on apple pectin / D. Constenlda, A. G. Ponge, J.E. Lozano // LWT Food Science and Technology. 2002. V. 35. № 3. P. 216-221.
- 99. Fertonani, H. C. R. Influence of acid concentration on extraction and quality of apple pomace pectin / H. C. R. Fertonani, A. Scabio, M. H. Canterischemin et al. // Semina: Ciências Agrárias. − 2006. V. 27. № 4. P. 599-612.
- 100. Халиков, Д.Х. Гидродинамические свойства пектиновых веществ при различных температурах / Д.Х. Халиков, Х.Х. Авлоев, З.К. Мухидинов и др. // Доклады АН РТ. 2010. Т. 53. № 6. С. 467-471.
- 101. Rees, D.A. Polysaccharide conformation of solutions and gels. Recent results on pectins / D.A. Rees // Carbohydr. polymer. 1982. V. 2. № 4. P. 259.
- 102. Masuelli, M.A. Viscometric study of pectin. Effect of temperature on the hydrodynamic properties International / M.A. Masuelli // Journal of Biological Macromolecules. 2011. № 48. P. 286–291.
- 103. Morris, G.A. A hydrodynamic study of the depolymerisation of high methoxy pectin at elevated temperatures / G.A. Morris, T.J. Foster, S.E. Harding // Carbohydrate Polymers. 2002. V. 48 № 4. P. 361-366.
- 104. Morri, G.A. Molecular flexibility of citrus pectins by combined sedimentation and viscosity analysis / G.A. Morri, J.G. Torreb, A. Ortega et al. // Food Hydrocolloids. 2008. V. 22. P. 1435–1442.

- 105. Muhidinov, Z.K. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of different pectins / Z.K. Muhidinov, M.L. Fishman, Ch.Ch. Avloev et al. // Polymer Sciences Journal, Series A. − 2010. − V. 52. № 12. P. 1257-1263.
- 106. Fishman, M. L. Pectin microgels and their subunit structure / M. L. Fishman, P. Cooke, B. Levaj et al. // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1992. № 294. P. 253–260.
- 107. Cesaro, A. Phisicochemical properties of pectin acid. I. Termodynamic evidence of a pH-induced conformational transition in aqueous solution / A. Cesaro, A. Ciana, F. Delben et al. // Bioplymers. 1982. V. 21. P. 431-449.
- 108. Cros, S. Solution conformations of Pectin polysaccharides: Determination of chain characteristics by small angele neutronscattering, viscometry and molecular modeling / S. Cros, C. Garnier, M.A.V. Axelos et al. // Biopolymers. 1996. V. 39. P. 339-352.
- 109. Manning, G.S. Limiting Laaws and conterion condensation in Polyelectrolyte solutions. I. Colligative Properties / G.S. Manning // J. Chem. Phys. 1969. V. 51. № 3. P. 924-933.
- 110. Manning, G.S. Limiting Laaws and conterion condensation in Polyelectrolyte solutions. II. Self –Diffusion of the small ions / G.S. Manning // J. Chem. Phys. 1969. V. 51. № 3. P. 934-938.
- 111. Vincken, J. P. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture / J. P. Vincken, H. A. Schols, R. Oomen et al. // Plant Physiology. 2003. V. 132. № 4. P. 1781–1789.
- 112. Ralet, M.C. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: Characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties / M.C. Ralet, V. Dronnet, H. C Buchholt et al. // Carbohydrate Research. 2001. V. 336. № 2. P. 117–125.

- 113. Rinaudo, M. Physicochemical properties of pectins in solution and gel states, in: J. Visser, A.G.J. Voragen (Eds.) Pectins and pectinases / M. Rinaudo // Elsevier. New York. 1996. P. 21–33.
- 114. Ridley, B.L. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling / B.L. Ridley, M.A. O'Neill, D. Mohnen // Phytochemistry. 2001. V. 57. P. 929–967.
- 115. Caffall, K.H. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides / K.H. Caffall, D. Mohnen // Carbohydr. Res. 2009. V. 344.
 P. 1879–1900.
- 116. Hotchkiss, A.T. Enzymatic modification of pectin to increase is calcium sensitivity while preserving its molecular weight / A.T. Hotchkiss, B.J. Savary, R.G. Cameron et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. V. 50. P. 2931–2937.
- 117. Savary, B.J. Valencia orange peel pectin methylesterases and their use for generating novel pectin products, in: A. Voragen, H. Schols, R. Visser (Eds.), Advances in pectin and pectinase research / B.J. Savary, A.T. Hotchkiss, M.L. Fishman et al. // Kluwer Press, Dordrecht, Netherlands. 2003. P. 345-361.
- 118. Yoo, S.H. Monovalent salt-induced gelling system of enzymatically deesterified pectin / S.H. Yoo, M.L. Fishman, B.J. Savary et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003. № 51. P. 7410–7417.
- 119. Кавабата, А. Молекулярный вес и молекулярные размеры пектинов (пер. с японского) / А. Кавабата, С. Саваяма // Ниппон Ногейкагаку Кайши. 1977. Т. 51. № 1. С.15-21.
- 120. Saverbon, S. Sedimentation and diffusion measurements on pectic substances / S. Saverbon // Kolloid Z. − 1940. № 90. P. 41-50.

- 121. Harding, S.E. The molecular-weight distribution and conformation of citrus pectins in solutions studied by hydrodynamics / S.E. Harding, G. Berth, A. Ball et al. // Carbohydrate Polymers. − 1991. № 6. P. 1–15.
- 122. Berth, G. Scattering and viscosimetric studies for molecular weight determination on pectin in aqueous solution / G. Berth, H. Anger, F. Linow // Nahrung. 1977. V. 21. № 10. P. 939-950.
- 123. Berth, G. Studies on the Heterogenity of Citrus Pectin by gel permeation chromatography on sepharose 2B/4B / G. Berth // Carbohydr. Res. 1988. V. 8. P.105-117.
- 124. Anger, H.Gel permeation chromatography of sunflowers pectin / H. Anger, G. Berth // Carbohydr. Polym. 1985. V.5. № 5. P. 241-250.
- 125. Fishman, M.L. A Critical Reexamination of Molecular Weight and Dimentions for Citruse Pectins. In Fishman M.L., Jen J.J. Chemistry and Function of Pectin / M.L. Fishman, L. Pepper, W.C. Damert et al. // ACS Symposium series. 1986. V. 310. P. 22.
- 126. Fishman, M.L. Characterization of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure / M.L. Fishman, H.K. Chau, P. Hoagland et al. // Carbohydr Res. 2000. № 323. P. 126–38.
- 127. Podzimek, S. Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation powerful tools for the characterization of polymers, protein and nanoparticles / S. Podzimek // A John Wiley & Sons, Inc. New Jersey: Hoboken Publisher. 2011. P. 333.
- 128. Халиков, Д.Х. Влияние молекулярной массы на желирующие свойства пектина. Аналитическое ультрацентрифугирование в химии и биологии. Под ред. В.П. Панова / Д.Х. Халиков, А.Ш. Штанчаев, З.К. Мухидинов.- Душанбе: Дониш. 1987. С. 140-145.

- 129. Morris, G. A. The effect of degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin / G. A. Morris, T. J. Foster, S.E. Harding // Food Hydrocolloids. 2000. № 14. P. 227–235.
- 130. Pavlov, G.M. Conformation zoning of large molecules using the analytical ultracentrifuge / G.M. Pavlov, A.J. Rowe, S.E. Harding // Trends in Analytical Chemistry. 1997. № 16. P. 401–405.
- 131. Халиков, Д.Х. Кислотный гидролиз протопектина корзинки подсолнечника / Д.Х. Халиков, З.К. Мухидинов, Х.Х. Авлоев // Доклады АН РТ. 1996. Т. 39. № 11. С. 76-80.
- 132. Афанасьев, С.П. Модификация титриметрического метода анализа пектиновых веществ / С.П. Афанасьев, Э.П. Панова, Г.Н. Кацева и др. // Хим. Природ. Соед. 1984. № 4. С. 428-431.
- 133. CP Kelco Control methods / Determination of degree of methyl esterification.

 March 7. 2001. P. 3.
- 134. Усманова, С.Р. Исследование ИК-Фурье спектров пектина тыквы / С.Р. Усманова, А.С. Джонмуродов, Х.И. Назирова и др. // Материалы 12 Нумановские чтения посвящ. 55 летию со дня рождения д.х.н., профессора Куканиева М.А. Душанбе, 2015 г. С. 143-145.
- 135. Fellah, A. Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations / A. Fellah, P. Anjukandi, M.R. Waterland et al. // Carbohydrate Polymers. 2009. № 78. P. 847.
- 136. Filisetti-Cozzi, T. M. C. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars / T. M. C. C. Filisetti-Cozzi, N. C. Carpita // Analytical Biochemistry. 1991. № 197. P. 157–162.

- 137. Fishman, M. L. Flash extraction of pectin from orange albedo by steam injection / M. L. Fishman, P. N. Walker, H. K. Chau et al. // Biomacromolecules. 2003. V. 4. P. 880–889.
- 138. Джонмуродов, А.С. Физико-химические и гидродинамические свойства пектиновых полисахаридов подсолнечника / А.С. Джонмуродов, Х.И. Тешаев, Ш.Ё. Холов и др. // Изв. АН РТ. Отд. физ-мат., хим., геол. и техн. н. − 2015. Т. 58. № 3. С. 241-247.
- 139. Джонмуродов, А.С. Строение пектиновых полисахаридов солерастворимой фракции подсолнечника / А.С. Джонмуродов, Х.И. Тешаев, Ш.Ё Холов и др. // ДАН РТ. 2015. –Т. 58. № 4.- С. 320-325.
- 140. Dzhonmurodov, A.S. Pectic polysaccharides from pumpkin fruit. In Gum and Stabiliser for Food Industry 18. Ed. P.A. Williams and G.O. Philips / A.S. Dzhonmurodov, Z.K. Muhidinov, G. D. Strahan et al. // RSC Publication. 2016. In press.
- 141. Тешаев, Х.И. Характеристика пектина полученного новым методом гидролиза-экстракции из корзинки подсолнечника / Х.И. Тешаев, З.К. Мухидинов, Р.М. Горшкова и др. // Вестник Воронежского Госуниверситета инженерных технологий. 2012. Т. 52. № 2. С. 162-168.
- 142. Горшкова, Р.М. Полисахариды ревеня скального (Rheum rupestre) / Р.М Горшкова, З.К. Мухидинов, А.С. Насриддинов и др. // Изв. Вузов. Химия и хим. технология. 2010. Т. 53. № 6. С. 87-90.
- 143. Мухидинов, З.К. Молекулярная масса пектинов, полученных в автоклаве / З.К. Мухидинов, М.L. Fishman. Р.М. Горшкова и др. // Хим. Ж. Казахстана. 2008. спец. выпуск 21. С. 83-87.
- 144. Мухидинов, З.К. Анализ ММР пектинов, полученных в автоклаве / З.К. Мухидинов, М.L. Fishman, Р.М. Горшкова и др. // Хим. Ж. Казахстана. 2008. спец. выпуск 21. С. 83-87.

- 145. Launay, B. In: Mitchell J.R., Ledward D.A., editors. Functional Properties of Food Macromolecules / B. Launay, J.L. Doublier, G. Cuvelier - London: Elsevier Applied Science. – 1986. - P. 1-78.
- 146. Джонмуродов, А.С. Концентрирование и очистка пектиновых полисахаридов на полупромышленной диаультрафильтрационной установке / А.С. Джонмуродов, Х.И. Тешаев, Р.М. Горшкова и др. // Известия АН РТ. 2010. Т. 141. № 4. С. 45-49.
- 147. Patra, P. Structure elucidation of an immunoenhancing pectic polysaccharide isolated from aqueous extract of pods of green bean (*Phaseolus vulgaris L.*) / P. Patra, D. Das, B. Behera et al. // Carbohydrate Polymers. 2012 V. 87. P. 2169–2175.
- 148. Ko*st'álová, Z. Structural diversity of pectins isolated from the Styrian oilpumpkin (Cucurbita pepo var. styriaca) fruit / Z. Ko*st'álová, Z. Hromádková, A. Ebringerová // Carbohydrate Polymers. 2013. № 93. P. 163–171.
- 149. Lopes da Silva, J.A. Food polysaccharides and their application. Eds. Alistair
 M. Stephen, Glyn O. Phillips. Peter A. Williams / J.A. Lopes da Silva, M.A.
 Rao // CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group. NY. 2006.
- 150. Burchard, W. Information on Polydispersity and Branching from Combined Quasi-Elastic and Integrated Scattering / W. Burchard, M. Schmidt, W.H. Stockmayer // Macromolecules. 1980. V. 13. P. 1265.
- 151. Zeman Leos, J. Microfiltration and Ultrafitration, Principles and Applications / J. Zeman Leos, Zydney, L. Andrew New York: Marcel Dekker, Inc. 1996.
- 152. Briggs, S. Modified citrus pectin may halt metastasis / S. Briggs // Nutrition science news. 1997.
- 153. Walker, M. Anticancer attributes of modified citrus pectin / M. Walker //
 Townsend letter for doctors and patients. 1996.

- 154. Linehan, W. Inhibition of prostate cancer metastasis: A critical challenge ahead / Linehan W. // J. Nat. Cancer Inst. 1995. № 87. P. 331-332.
- 155. Oakenfull, D. Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins / D. Oakenfull, A. Scott // J. of Food Science. 1984. № 49. P. 1093–1098.
- 156. O'Brien, A.B. Gelation of high-methoxyl pectin by enzymatic de-esterification in the presence of calcium-ions: a preliminary evaluation / A.B. O'Brien, K. Philp, E.R Morris // Carbohydrate Research. − 2009. № 344. P. 1818–1823.
- 157. Grosso, C.R.F. Dynamic rheology of structure development in low-methoxyl pectin + Ca²⁺ + sugar gels / C.R.F. Grosso, M.A. Rao // Food Hydrocolloids. 1998. № 12. P. 357–363.
- 158. Capel, F. Influence of chain length and polymer concentration on the gelation of (amidated) low-methoxylated pectin induced by calcium / F. Capel, T. Nicolai, D. Durand et al. // Biomacromolecules. 2005. № 6. P. 2954–2960.
- 159. Löfgren, C. Microstructure and kinetic rheological behaviour of amidated and nonamidated LM pectin gels / C. Löfgren, S. Guillotin, A.M. Hermansson // Biomacromolecules. 2006. № 7. P. 114–121.
- 160. Löfgren, C. Microstructure and rheological behaviour of pure and mixed pectin gels / C. Löfgren, P. Walkenström, A.M. Hermansson // Biomacromolecules. 2002. № 3. P. 1144–1153.
- 161. Böttger, L. Gelling temperature determination in pectin-based systems / L. Böttger, S.H. Christensen, H. Stapelfeldt // Gums and Stabilisers for the Food Industry. 2008. № 14. P. 153–163.
- 162. Dobies, M. Studies of gelation process investigated by fast field cycling relaxometry and dynamic rheology: the case of aqueous low methoxyl pectin solutions / M. Dobies, M. Kozak, S. Jurga // Solid State Nuclear Magnetic Resonance. 2004. № 25. P. 188–193.

- 163. Dahme, A. Gelpoint measurements in high-methoxyl pectin gels by different techniques / A. Dahme // J. of Texture Studies. 1992. № 23. pp. 1–11.
- 164. Siew, C.K. New insights into the mechanism of gelation of alginate and pectin: charge annihilation and reversal mechanism / C.K. Siew, P.A. Williams // Biomacromolecules. 2005. № 6. P. 963–969.
- 165. Тешаев, Х.И. Поведение низкометилированных пектинов в растворе и изучение их гелеобразующих свойств с ионами поливалентных металлов: автореф. дис. ... канд. тех. наук: 02.00.04 / Тешаев Хуршед Икромович. Душанбе, 2004. 21 с.
- 166. Fu, J.T. Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: the effect of sucrose / J.T. Fu, M.A. Rao // Food Hydrocolloids. 2001. № 15. P. 93–100.
- 167. Loefgren, C. Pectins structure and gel forming properties, a literature study: PhD work at the Department of Food Science / C. Loefgren. Chalmers University of Technology, Sweden, 2000.
- 168. Cardoso, S.M. Temperature dependence of the formation and melting of pectin–Ca²⁺ networks: a rheological study / S.M. Cardoso, M.A. Coimbra, J.A. Lopes da Silva // Food Hydrocolloids. − 2003. № 17. P. 801–807.
- 169. Neidhart, S. Investigation of the influence of various cations on the rheological properties of high-esterified pectin gels. J. Visser, A.G.J. Voragen (Eds.), Pectins and pectinases / S. Neidhart, C. Hannak, K. Gierschner // Elsevier. 1996. P. 583–591.
- 170. ГОСТ 29186-91. Пектин. Технические условия. Введ. 1993-01-01. М.: Изд-во стандартов, 1992. 21 с.