

Реферат

Выпускная квалификационная работа с. 76, рис. 10 табл. 20, источников 47.

Ключевые слова: полисахариды, ксантан, фенол – серный метод, карбазол – серный метод, УФ-спектроскопия.

Объектом исследования являются экзополисахариды, полученные лабораторным синтезом, с использованием бактерии *Xanthomonas campestris*, а также коммерческий ксантан.

Цель работы: определить нейтральные и кислых сахара в образцах ксанта́на методами УФ-спектроскопии.

В научно – исследовательской работе определены нейтральные и кислые сахара в образцах ксанта́на с использованием инструментальных методов анализа.

В результате исследования были подобраны рабочие условия определения нейтральных и кислых сахаров в образцах ксанта́на. Проведено определение нейтральных и кислых сахаров в образцах ксанта́на, полученных лабораторным способом, с использованием бактерии *Xanthomonas campestris*, а также в образцах коммерческого ксанта́на.

Потенциальными потребителями результатов НИР могут быть фармацевтические компании, медицинские учреждения и лаборатории разных профилей.

В будущем планируется определить мономерный состав экзополисахарида ксантан методом капиллярного электрофореза.

Оглавление

Номер раздела	Наименование раздела	Стр.
	Введение	13
Глава 1	Литературный обзор	15
1.1	Структура и свойства полисахаридов	15
1.2	Строение полисахаридов	17
1.3	Объект исследования – ксантан	18
1.4	Применение полисахаридов	20
1.5	Методы характеристики полисахаридов	22
Глава 2	Экспериментальная часть	25
2.1	Химические реактивы, оборудование, посуда	25
2.2	Описание методик определения нейтральных и кислых сахаров в образцах ксантина	25
Глава 3	Обобщение результатов	30
3.1	Определение нейтральных сахаров в образцах ксантина фенол-серным методом	30
3.2	Определение кислых сахаров в образцах ксантина карбазол-серным методом	33
Глава 4	Социальная ответственность	36
4.1	Характеристика объекта исследования и области его применения	36
4.2	Производственная безопасность	37
4.3	Экологическая безопасность	45
4.4	Безопасность в чрезвычайных ситуациях	46
4.5	Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	48
Глава 5	Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность, ресурсосбережение	50

5.1	Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	51
5.1.1	Потенциальные потребители результатов исследования	51
5.1.2	Анализ конкурентных технических решений	51
5.1.3	SWOT-анализ	52
5.2	Планирование научно-исследовательских работ	56
5.2.1	Структура работ в рамках научного исследования	56
5.2.2	Определение трудоемкости выполнения работ	57
5.2.3	Разработка графика проведения научного исследования	59
5.2.4	Бюджет научно-технического исследования (НТИ)	63
5.3	Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	68
	Выводы	71
	Список литературы	72

Введение

Научно-исследовательская работа (НИР) связана с определением нейтральных и кислых сахаров в образцах экзополисахаридов типа ксантан.

Полисахариды - важнейший класс биоорганических соединений, находящихся практическое применение в различных областях науки и техники. Полисахариды в последние годы привлекают внимание исследователей в связи с тем, что являются веществами с широким спектром биологической активности.

Разнообразные по структуре и физико-химическим характеристикам растительные полисахариды обладают обширным набором фармакологических свойств. Они снижают такой важный фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний, как уровень холестерина в сыворотке крови. Показано, что ряд производных биополимеров полисахаридного типа проявляют антикоагулянтную активность. Кроме того, некоторые биополимеры можно рассматривать как пребиотики, т. е. пищевые ингредиенты, стимулирующие рост полезной микрофлоры кишечника и ограничивающие размножение патогенных бактерий [1].

Кроме того, полисахариды являются перспективными веществами для получения новых соединений путем химической модификации, используемых в нефтедобыче, буровых работах, повышение урожайности, пищевой, и косметической промышленности.

Так, например, наиболее известный микробный полисахарид — ксантан как добавка, улучшающая качество различных продуктов и технологических операций (пищевая, фармацевтическая и косметическая промышленность, повышение урожайности, нефтедобычи, буровые работы, и т. д.).

На качество ксантана, полученного разными методами, оказывает влияние содержание нейтральных и кислых сахаров, которые необходимо количественно определять, как в процессе отработки технологии получения, так и в готовой продукции.

В связи с этим целью работы является:

Определение нейтральных и кислых сахаров в образцах ксантана методами УФ-спектроскопии.

Объектами исследования являются экзополисахариды, полученные лабораторным синтезом, с использованием бактерии *Xanthomonas campestris*, а также коммерческий ксантан в качестве образца сравнения.

Задачи исследования:

1. подобрать рабочие условия определения нейтральных сахаров фенол-серным методом;
2. определить нейтральные сахара в коммерческом ксантане, и в образцах экзополисахаридов, полученных лабораторным синтезом, с использованием бактерии *Xanthomonas campestris*;
3. подобрать рабочие условия определения кислых сахаров карбазол-серным методом;
4. определить кислые сахара в коммерческом ксантане, и в образцах экзополисахаридов, полученных лабораторным синтезом, с использованием бактерии *Xanthomonas campestris*.

Потенциальными потребителями результатов НИР могут быть фармацевтические компании, медицинские учреждения, лаборатории контроля качества разных профилей.

Результаты НИР, также могут быть использованы в научно – исследовательских лабораториях, НИИ Питания и здравоохранения.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Структура и свойства полисахаридов

Полисахариды (полиозы, полиозиды, полиголосохариды, полигликозы, полигликозаны, полиголозиды, гликаны) – высокополимерные углеводы, состоящие из остатков моносахаридов, соединенных глюкозидными связями и не содержащие других неуглеводных компонентов. Многие виды полисахаридов (хитин, крахмал, пектиновые вещества, гемицеллюлозы, лихенин, гликоген, декстран и др.) широко распространены в животных, микроорганизмах и растениях, также в качестве биополимеров выполняют различные функции [2].

По химической классификации полисахариды делятся, на два класса: гомополисахариды, в состав которых входит один единственный моносахарид, т. е. «гомогенные», и гетерополисахариды, т. е. полисахариды, которые состоят из двух или более различных моносахаридов.

Гомополисахариды в зависимости от того, состоят ли они из гексоз или пентоз, разделяются на гексозаны и пентозаны и далее на глюканы, маннаны, галактаны, ксиланы, арабаны, фруктозаны, уронины и т. д. по имени моносахарида, являющегося их мономерной единицей.

Строгая классификация и номенклатура гетерополисахаридов отсутствуют [3].

Структурные полисахариды можно разделить на два класса. К первому классу относят нерастворимые в воде полимеры, образующие волокнистые структуры и служащие армирующим материалом клеточной стенки (целлюлоза высших растений и некоторых водорослей, хитин грибов, Р-D-ксиланы и р-D-маннаны некоторых водорослей и высших растений). Ко второму классу относят гелеобразующие полисахариды, обеспечивающие эластичность клеточных стенок и адгезию клеток в тканях. Характерными представителями этого класса полисахаридов являются сульфат гликозаминогликаны (мукополисахариды) соединительные ткани животных, сульфат галактаны

красных водорослей, альгиновые кислоты, пектины и некоторые гемицеллюлозы высших растений [4].

Также полисахариды можно классифицировать:

1) по кислотности:

кислые;

нейтральные.

Кислые полисахариды – кислые сахара (глюкуроновая, галактуроновая, маннуриновая кислоты) [5]. Структурные формулы галактуриновой кислоты и маннуриновой кислоты представлены на рис. 1 - 2 [6].

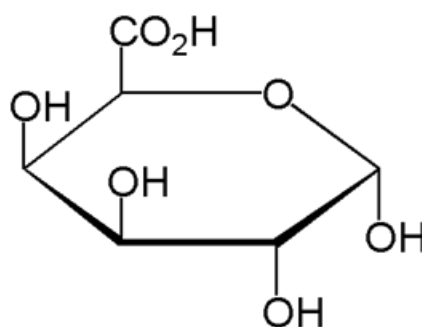
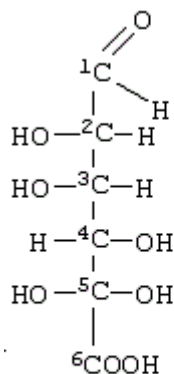


Рисунок 1 Структурная формула галактуриновой кислоты



D-маннуриновая
кислота

Рисунок 2 Структурная формула маннуриновой кислоты

Представителями кислых полисахаридов являются пектины, альгинаты, каррагинаты, фукоиданы и рамногалактуронаны, ксантан.

Нейтральные полисахариды – разветвленные макромолекулы, основными звеньями которых являются нейтральные сахара. Представителями нейтральных полисахаридов являются β -глюканы, арабиногалактаны, ксиланы, маннаны, арабинаны.

2) по происхождению:

Растительные полисахариды (целлюлоза, камеди, клетчатка, инулин, пектиновые вещества, амилоза, амилопектин, ламинарин и т.д.);

зоополисахариды (гликоген, хитин, хондроитинсульфаты, гепарин и т.д.);
полисахариды микроорганизмов (маннаны, экзогликаны, эндогликаны).

В зависимости от функций полисахариды делятся на:

- 1) каркасные (конструктивные) – хитин, клетчатка; и т.д.
- 2) энергетические (резервные, запасные) – гликоген, инулин, альгиновые кислоты, крахмал, слизи,
- 3) защитные – гиалуроновая кислота и гепарин - в тканях животных, камеди и слизи - у растений [7].

1.2 Структура полисахаридов

К полисахаридам относят соединения, молекулы которых содержат более десяти моносахаридных звеньев, связанных О-гликозидной связью. Чаще всего полисахариды состоят из нескольких сотен и даже тысяч моносахаридных остатков, образующих линейные (а) или разветвленные (б) полимерные цепи (рис.3).

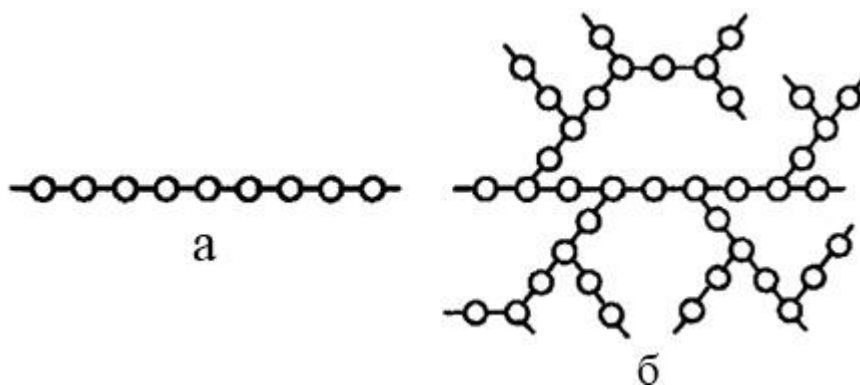


Рисунок 3 Линейные (а) и разветвленные (б) полимерные цепи полисахаридов

Гликозидные связи в полисахаридах, как правило, образуются за счет гликозидного гидроксила одного и спиртового гидроксила другого моносахаридных остатков [8].

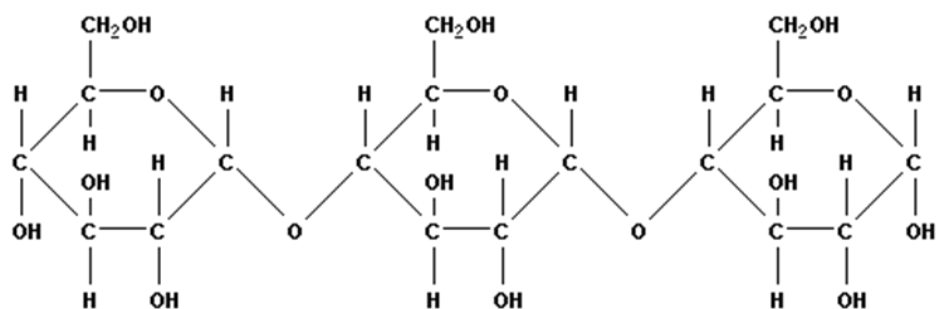
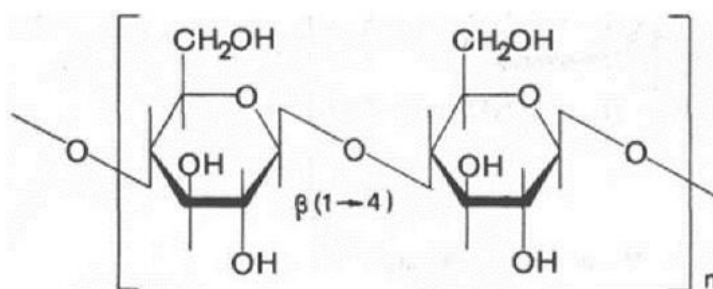


Рисунок 4 Структурная формула крахмала



Участок молекулы целлюлозы

Рисунок 5 Структурная формула целлюлозы

1.3 Объект исследования – ксантан

Ксантановая камедь (ксантан) — природный полисахаридный биополимер, относится к группе стабилизаторов.

По химической природе ксантан представляет собой полисахарид, полученный путем ферментации с использованием бактерии *Xanthomonas campestris*. В жизненном цикле бактерий служит им защитой от вирусов и пересыхания, поэтому может использоваться в косметических средствах для увлажнения кожи. Производство ксантана основано на аэробном брожении в водном растворе углеводов (глюкозы, сукрозы или лактозы), источника азота и др., после чего среду пастеризуют и осаждают спиртом или очищают методом микрофильтрации [9].

Ксантан состоит из пентасахаридных повторяющихся элементарных подзвеньев. Он состоит из двух D-глюкопиранозильных звеньев, двух D-маннопиранозильных звеньев и звена D-глюкопиранозилуроновой кислоты в соответствии с определением, проведенным в результате анализа

метилования и деструкции уроновой кислоты. Молекула включает β -D-глюкопиранозильную основную цепь со связью (1 $\rightarrow$ 4), обнаруживаемую у целлюлозы, при наличии трисахаридной боковой цепи, присоединенной в положении О-3 на каждом втором глюкозильном звене. Структура боковой цепи такова, что по бокам от D-глюкуронозильного звена располагаются два маннозильных звена. Приблизительно половина концевых D-маннозильных звеньев имеют звено пирувиновой кислоты в положениях О-4 и О-6. Другое D-маннозильное звено замещено в положении О-6 ацетальной группой. Молекулярная масса натурального ксантана, как сообщалось, примерно 2-4 миллиона, которые будут соответствовать приблизительно 2000-4000 повторяющихся звеньев в полимерной молекуле. Хотя значения достигает 50 миллионов, как сообщают последние исследования [10].

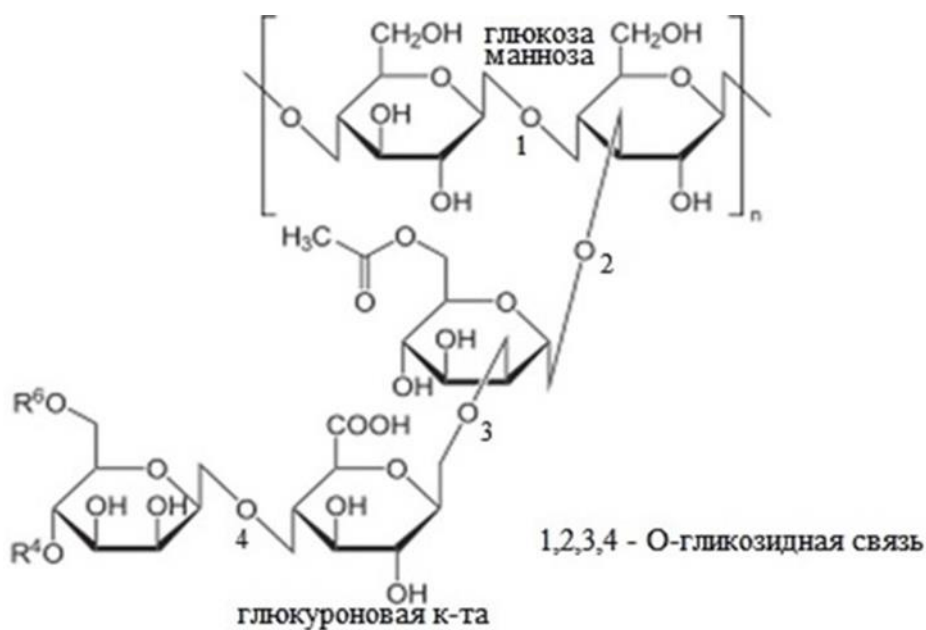


Рисунок 6 Структурная формула ксантана

Свойства ксантана регулируют путем изменения условий жизни бактерий. В коммерческих препаратах для пищевых целей кислотные группы нейтрализуют с образованием кальциевых, натриевых или калиевых солей [9]. Растворимость ксантанов и их состояние в воде определяется особенностями химического строения. Наличие карбоксильных (остатки глюкуроновых кислот) и пируватных кислотных групп обеспечивает молекулам ксантана достаточно высокий отрицательный заряд. Благодаря наличию

регулярных боковых звеньев с кислотными группировками происходит взаимное отталкивание отдельных молекул, что приводит к увеличению их гидратации и, как следствие, к раскручиванию спиралевидных макромолекул. В связи с этим, ксантаны растворяются в воде уже при комнатной температуре. Кроме того, они растворяются в горячем молоке, а также в растворах соли и сахара. Ксантаны образуют растворы высокой вязкости, которые стабильны в диапазоне pH от 1 до 3. Совместимость биополимера с электролитами в высоких концентрациях (дубильной кислотой, бурой, хлоридами, цитратами) и сахарами позволяет эффективно использовать его в фармацевтической промышленности. В медицине ксантан применяется в качестве иммуноадьювантов [28].

Способ получения ксантана

Ксантан, продуцируемый *Xanthomonas campestris*, выпускают под названиями: биополимер Хе, келцан, ксантан, келтрол. Бактерии культивируют на среде, содержащей 1—5 % углеводов (сахар-сырец, меласса, кукурузный крахмал и др.), органическое соединение азота, двузамещенный фосфорнокислый калий и микроэлементы, pH среды 6,5—7,2. Инкубацию проводят в аэробных условиях, в течение 72 часов, при 28⁰С. Для улучшения свойств полисахарида к среде во время ферментации добавляют формальдегид. Добавка позволяет получать гликан с повышенной устойчивостью к различным неблагоприятным факторам, в том числе к температуре и засолению. Полимер используют в виде раствора вязкой культуральной жидкости или в виде порошка, высушенного в струе горячего воздуха. В последнем случае полисахарид отделяют от клеток центрифугированием и очищают осаждением этанолом, метанолом или ацетоном в присутствии электролита [11].

1.4 Применение полисахаридов

В настоящее время полисахариды находят широкое применение в различных сферах человеческой деятельности: в химической,

фармацевтической, пищевой, текстильной и нефтяной промышленности, медицине, гидрометаллургии и в ряде других областей.

Возможность и перспективы использования микробных полисахаридов в медицине в большей степени определяется их биологической активностью.

Большинство микробных полисахаридов обладают профилактическим и лечебным действием: повышают устойчивость организма человека к бактериальным и вирусным инфекциям, положительно влияют на течение и исход воспалительных процессов, обладают противоопухолевой активностью, способствуют заживлению ран и восстановлению тканей, понижают побочное действие лекарственных препаратов и рентгенотерапии, устраняют болевой синдром. Лечебное и защитное действие полисахаридов определяется, прежде всего, их способностью повышать неспецифическую иммунобиологическую реактивность организма, оказывать влияние на различные защитные реакции, поддерживающие постоянство его внутренней среды. Преимущества многих полисахаридных препаратов перед другими средствами, повышающими неспецифическую резистентность организма, определяются тем, что они свободны от примесей, оказывающих нежелательное действие на организм.

В пищевой промышленности полисахариды используются в качестве пленок для покрытия продуктов, например сыров, для защиты их от высыхания и плесневения, в качестве стабилизаторов фруктовых соков, мороженого, джемов, желе и других кулинарных изделий. Особенно перспективным в этом плане считается ксантан.

Анионные полисахариды (ксантан, занфло — внеклеточный гетерогликан *Erwinia tahitica*, состоящий из глюкозы, галактозы, фукозы, уроновой кислоты и ацетильных групп, и др.) стабилизируют и предохраняют от высыхания катионные водные эмалевые краски. Сульфаты ксантана используются как загустители клеев.

Водные растворы некоторых полисахаридов отличаются особой стабильностью в условиях агрессивной среды и резких перепадов температуры. Такие полисахариды используются в газо- и нефтедобывающей

промышленности в качестве стабилизаторов и структурообразователей промывных жидкостей, предназначенных для бурения нефтяных и газовых скважин, и обеспечивают более полное извлечение нефти из нефтеносных пластов. Уже около 15 лет назад более половины нефти в США добывали с помощью полисахаридов, главным образом ксантана [11].

1.5 Методы характеристики полисахаридов

Колориметрические и спектрофотометрические методы

Колориметрические и спектрофотометрические методы необходимы для количественного определения полисахаридов. Они, как правило, основаны на измерении показателей поглощения при определенной длине волны после проведения цветной реакции продуктов кислотного гидролиза полисахаридов. К этим методам можно отнести фенол-серный метод и его модификации. Метод основан на реакции взаимодействия фенолов с продуктами окисления моносахаров, образующихся после разрушения полимерных молекул полисахаридов концентрированной серной кислотой. Преимуществом метода является возможность избирательного определения кислых и нейтральных сахаров. Эта особенность основана на различиях в УФ-спектрах продуктов деградации нейтральных и кислых сахаров. Так, известно, что фурфурол образуется при деградации нейтральных пентоз, а гидроксиметилфурфурол – нейтральных гексоз. Тогда, как 2-фуранокарбоновая и 5-формил-2-фуранокарбоновая кислоты образуются из уроновых кислот [13].

В качестве реагентов для проведения цветной реакции используется фенол [14] и его различные производные. Для определения уроновых кислот используют 3,5-диметилфенол [15-16], метагидроксидифенил [17] и карбазол [18-19]. Карбазол не содержит фенольной группы, однако, реагирует с продуктами разложения сахаров с образованием окрашенных продуктов.

Для увеличения селективности определения уроновых кислот в полисахаридах авторы предлагают модифицировать предложенные ранее спектрофотометрические методы. Так для уменьшения влияния нейтральных

сахаров на результаты определения уроновых кислот карбазол-серным методом авторы [20] разрушение полимерной молекулы серной кислотой проводят в присутствии сульфаминовой кислоты, которая препятствует реакции карбазола с образовавшимися при гидролизе полисахаридов с альдозами. Этот же подход был предложен для определения уроновых кислот с использованием μ -гидроксидифенила [21].

Автором методики определения уроновых кислот в образцах полисахаридов [22] доказано, что на воспроизводимость определения уроновых кислот карбазол-серным методом влияет температура инкубации образца с серной кислотой. Авторы предлагают нагревать смесь образца и концентрированной серной кислоты до 110°C вместо 80°C , указанное в оригинальной методике [23]. Кроме того, авторы предлагают медленное (по стенке сосуда) введение в образец концентрированной серной кислоты.

Методы, основанные на восстановлении ионов меди

В литературе отмечен метод определения уроновых кислот и кетогексоз, основанный на восстановлении ими ионов меди при pH 4,8 [24]. Селективность данного метода основана на том, что в таких условиях нейтральные альдозы, в отличие от уроновых кислот и кетоз, не восстанавливают ионы меди. В 2008 г. авторы [25] предложили модифицированный вариант этого метода для определения уроновых кислот в пектинах. Авторы использовали ферментативный гидролиз пектиназами с последующим колориметрическим анализом полученного гидролизата, основанного на принципе избирательного восстановления ионов меди кислыми сахарами. В качестве реагента для детекции восстановленной меди авторы предлагают использовать реактив Фолина-Чиокалтеу и, как альтернативный вариант, 2,2-бицинхонинат, предложенный ранее авторами [26]. Оба реактива образуют окрашенные продукты при нагревании с уроновыми кислотами и солями меди при pH 4,8. В присутствии глюкозы окраски смеси не наблюдалась. Измерение оптической плотности проводили при 750 нм, в случае реактива Фолина-Чиокалтеу и при 560 нм с 2,2-бицинхонинатом. К недостаткам, как оригинального метода, так и

модифицированного можно отнести влияние на результаты анализа содержание примесей (белки, органические кислоты, аминсахара). Таким образом, метод предпочтителен для определения уроновых кислот в очищенных фракциях полисахаридов. Помимо предложенных выше методов, существуют методы определения уроновых кислот в кислых полисахаридах (в пектинах), основанные на способности связывать ионы меди уроновыми кислотами. В этом случае определение может быть основано на спектрофотометрическом определении пектин-связанных ионов меди или, напротив, свободных ионов, оставшихся в растворе [27].

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Химические реактивы, оборудование, посуда

Используемые реактивы и стандартные вещества

Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72;

Кислота серная H_2SO_4 , ГОСТ 14262-78, химически чистый (х.ч.);

Спирт этиловый очищенный 95%, ГОСТ Р 51723-2001, химически чистый (х.ч.);

N-(2,3-эпоксипропил) карбазол, ТУ 6-09-10-1038-75;

Коммерческий ксантан Company Plasma Product Specification (Китай);

D (+) – Глюкоза (Fluka, Германия);

D (+) – Галактуроновая кислота (Fluka, Германия);

Оборудование, используемое для выполнения НИР

Весы аналитические (класс точности 0,0001 г) (СЕ 124-С, СЕ 224-С, производитель Сартогосм, Россия);

Дозатор 1-канальный, переменного объема 100-1000 мкл (Россия);

Спектрофотометр универсальный Agilent Cary 60 (Германия);

Электрическая плитка TERMIA;

Водяная баня;

Лабораторная химическая посуда, используемая для выполнения НИР

Пробирки химические ГОСТ 25336-82;

Пенициллиновые флаконы 10 см³ ГОСТ Р 53416-2009

Колбы мерные 50, 100 см³ ГОСТ 1770-74;

Цилиндр мерный с носиком 10 см³ ГОСТ 1770-74;

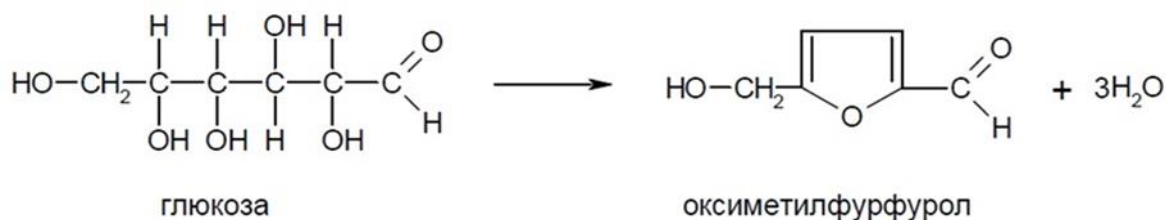
Стакан 25 см³ ГОСТ 1770-74.

2.2 Описание методик определения нейтральных и кислых сахаров в образцах ксантана

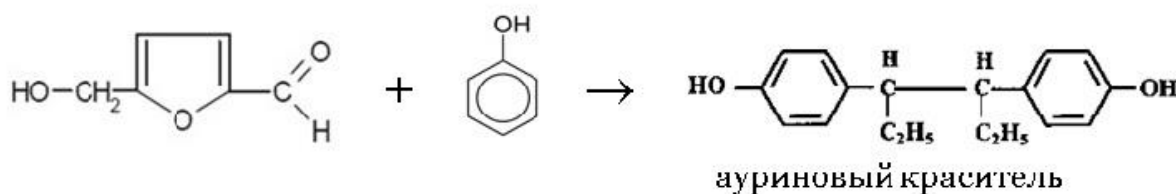
Методика определения нейтральных сахаров в образцах ксантана

В основе количественного определения нейтральных сахаров, в пересчете на глюкозу, в исследуемых образцах положена реакция взаимодействия

оксиметилфурфуrolа с фенолом в среде концентрированной серной кислоты. Сначала под воздействием серной кислоты глюкоза дегидратируется с образованием оксиметилфурфуrolа:



Затем при действии фенола на оксиметилфурфуrol образуется ауриновый краситель:



который имеет в видимой области спектра максимум поглощения при $\lambda = 483-485$ нм [12].

Описание методики

0,0021 г полисахарида растворили в 5 см³ воды. В пробирку внесли 1 см³ полученного раствора, 0,1 см³ водного 5% раствора фенола и 5 см³ концентрированной серной кислоты (раствор А). 0,1 см³ раствора А довели до метки в мерной колбе вместимостью 5 см³ концентрированной серной кислотой (раствор Б). 0,5 см³ раствора А довели до метки в мерной колбе вместимостью 5 см³ концентрированной серной кислотой (раствор В). 1,0 см³ раствора А довели до метки в мерной колбе вместимостью 5 см³ концентрированной серной кислотой (раствор С). Содержимое пробирок перемешивали и отстаивали в течение 1 часа. Параллельно в тех же условиях готовили растворы сравнения. 0,1 см³ 5% фенола и 5 см³ концентрированной серной кислоты (раствор сравнения А). К 0,1 см³ полученного раствора сравнения А приливали 5 см³ концентрированной серной кислоты (раствор сравнения Б). К 0,5 см³ раствора сравнения А добавляли 5 см³ концентрированной серной кислоты (раствор сравнения В). К 1 см³

полученного раствора сравнения А добавили 5 см³ концентрированной серной кислоты (раствор С).

Оптическую плотность полученных растворов Б, В, С измеряли на УФ – спектрофотометре, в кювете толщиной 10 мм, в диапазоне длин волн 190 – 800 нм.

Параллельно готовили стандартный раствор глюкозы.

0,0625 г D – глюкозы растворяли в воде в мерной колбе на 25 см³ (раствор А), 1 см³ раствора А разводили водой в мерной колбе на 5 см³ (раствор Б). К 0,1 см³ раствора Б приливали 0,1 см³ 5% фенола и 5 см³ концентрированной серной кислоты (раствор С). Параллельно готовили контрольный раствор сравнения – К 0,1 см³ воды добавили 0,1 см³ 5% фенола и 5 см³ концентрированной серной кислоты.

Расчет содержания глюкозы в исследуемых растворах проводили согласно формуле:

$$X\% = \frac{Ax \times C_{ст} \times W1 \times W2 \times 100}{A_{ст} \times a \times V} \times 100 \quad (1)$$

Где Ax – оптическая плотность исследуемого раствора; C_{ст} – концентрация стандартного раствора глюкозы; W1 – общий объем извлечения; W2 – общий объем после разбавления; A_{ст} – оптическая плотность стандартного раствора глюкозы; а – масса сырья; V – аликвота, взятая для разбавления.

Методика определения кислых сахаров в образцах ксантана

Изначально, для количественного определения галактурановой кислоты в исследуемых образцах использовался метод Тэйлора [33]. Метод основан на цветной реакции карбазола с продуктами окисления моносахаров, образующиеся после разрушения полимерных молекул полисахаридов концентрированной серной кислотой [12].

Описание методики по методу Тейлора:

Приготовление необходимых растворов.

Раствор карбазола: 0,1 г карбазола помещают в пенициллиновый флакон вместимостью 10 см³, растворяют в 95 % растворе этилового спирта.

Ход определения кислых сахаров:

1. 200 мкл исследуемого образца помещают в пробирку, прибавляют 3 мл серной концентрированной кислоты и 100 мкл раствора карбазола. Содержимое пробирки перемешивают.

2. Пробирки инкубируют на водяной бане, при температуре 60 °С, в течение одного часа. Затем охлаждают до комнатной температуры. Измеряют оптическую плотность полученных растворов относительно дистиллированной воды на УФ – спектрофотометре в кювете толщиной 10 мм в диапазоне длин волн 190 – 800 нм.

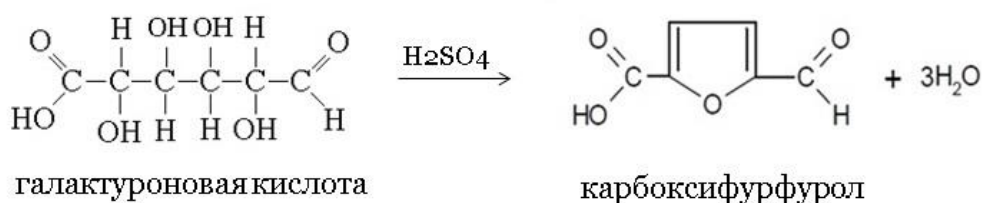
Следует отметить, что результаты определения плохо воспроизводились, поэтому методика подверглась следующим модификациям:

Проподготовка исследуемого образца: выдерживание образцов ксантана на водяной бане, при температуре 36 – 38 °С, в течение одного часа, для равномерного растворения;

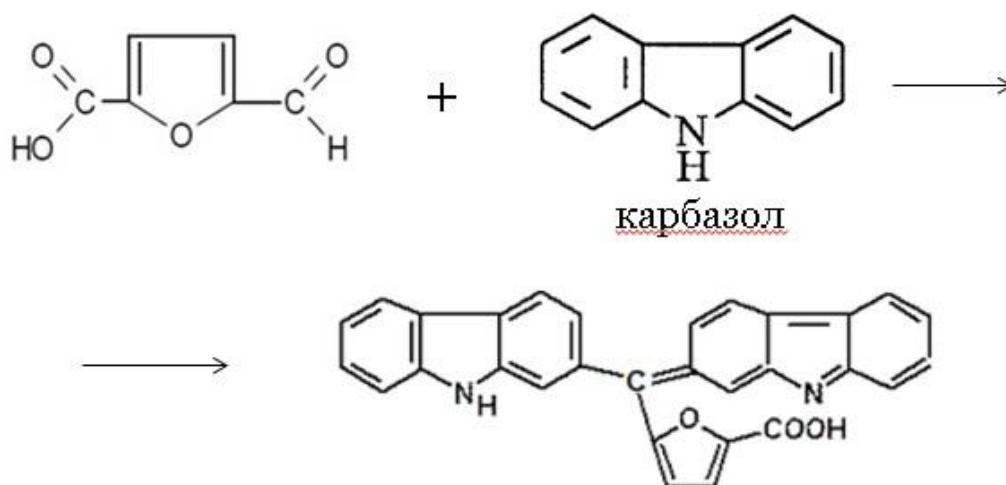
1. 200 мкл исследуемого образца помещают в пробирку, прибавляют 3 мл серной концентрированной кислоты, содержимое пробирки перемешивают. Пробирки инкубируют на водяной бане, при температуре 60 °С, в течение 20 минут. Затем охлаждают до комнатной температуры.

2. Прибавляют 100 мкл раствора карбазола. Измеряют оптическую плотность полученных растворов относительно дистиллированной воды на УФ – спектрофотометре в кювете толщиной 10 мм в диапазоне длин волн 190 – 800 нм.

Сначала под действием серной кислоты галактуроновая кислота дегидратируется с образованием карбоксифурфуrolа:



А далее при действии карбазола на карбоксифурфурол образуется окрашенный комплекс, который используют для фотометрического определения:



Параллельно готовили стандартный раствор галактурановой кислоты для построения градировочного графика.

Навески, D – галактурановой кислоты, массой 0,0005 – 0,005 г растворяют в воде в пенициллиновом флаконе на 10 см³ (раствор А). 200 мкл раствора А помещают в пробирку, прибавляют 3 мл концентрированной серной кислоты, содержимое пробирки перемешивают. Пробирки инкубируют на водяной бане, при температуре 60 °С, в течение 20 минут. Затем охлаждают до комнатной температуры и прибавляют 100 мкл раствора карбазола.

Расчет содержания галактурановой кислоты в исследуемых растворах проводили согласно формуле:

$$X\% = \frac{C_m \times M \times V}{1000 \times m_{обр.}} \times 100\% \quad (2)$$

Где C_m – молярная концентрация галактурановой кислоты; M – молярная масса галактурановой кислоты; V - объем исследуемого раствора; $m_{обр.}$ – масса образца.

Глава 3. Обобщение результатов

3.1 Определение нейтральных сахаров в образцах ксантана фенол-серным методом

Целью данного метода является количественное определение нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу.

В основу количественного определения нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в исследуемом образце положена реакция взаимодействия оксиметилфурфуrolа с фенолом в среде серной концентрированной кислоты. Сначала под воздействием концентрированной серной кислоты глюкоза дегидратируется в течение 45 минут до образования оксиметилфурфуrolа. А далее при действии фенола на оксиметилфурфуrol образуется ауриновый краситель, имеющий в видимой области спектра максимум поглощения λ_{max} 483-485 нм.

Данный метод обладает очень высокой чувствительностью (1-10 мкг/мл), точностью и надежностью, но необходимы определенные навыки при валидирования методики в условиях исследуемой лаборатории для воспроизведения результатов.

Для точного определения процентного содержания углеводов в пересчете на глюкозу в образцах ксантана использовали только свежеприготовленный стандартный раствор глюкозы, а также свежеприготовленный раствор 5% фенола, т.к. раствор фенола достаточно быстро окисляется на свету.

Было замечено, что оксиметилфурфуrol формируется в концентрированной серной кислоте в течение 45 минут, тогда как образование ауринового красителя при действии фенола происходит сразу при внесении фенола в реакционную среду.

На рисунке 7 представлены наглядные УФ-спектры ауринового красителя, сформированного при действии фенола на оксиметилфурфуrol.

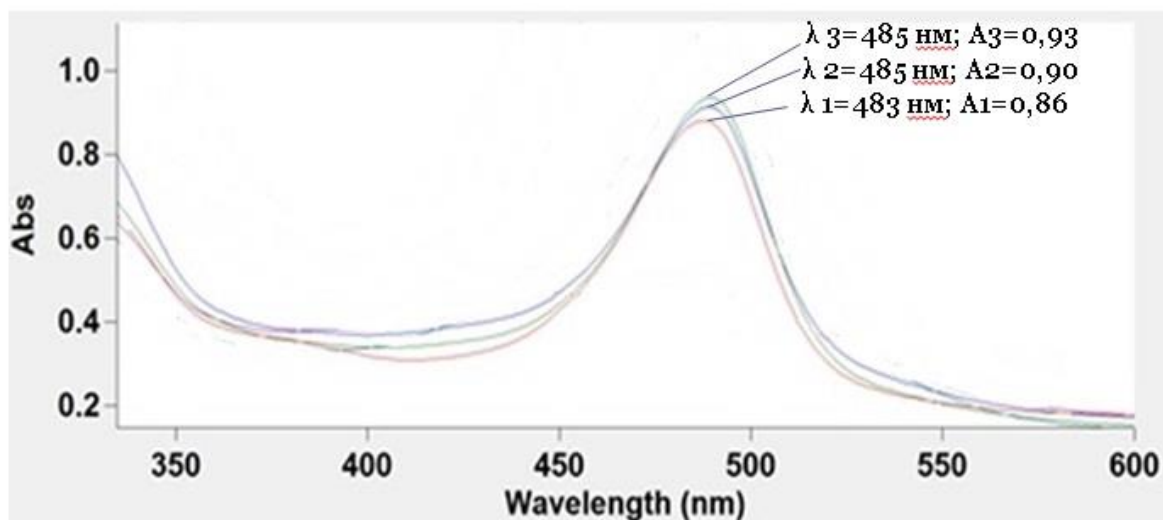


Рисунок 7 УФ-спектры поглощения ауринового красителя

Общее содержание глюкозы в исследуемых образцах ксантана определяли по методу градуировочного графика.

На рисунке 8 представлен градуировочный график зависимости оптической плотности раствора глюкозы от ее концентрации. Прямолинейная зависимость наблюдалась в области концентраций глюкозы от 0 до 0,0010 г/моль.

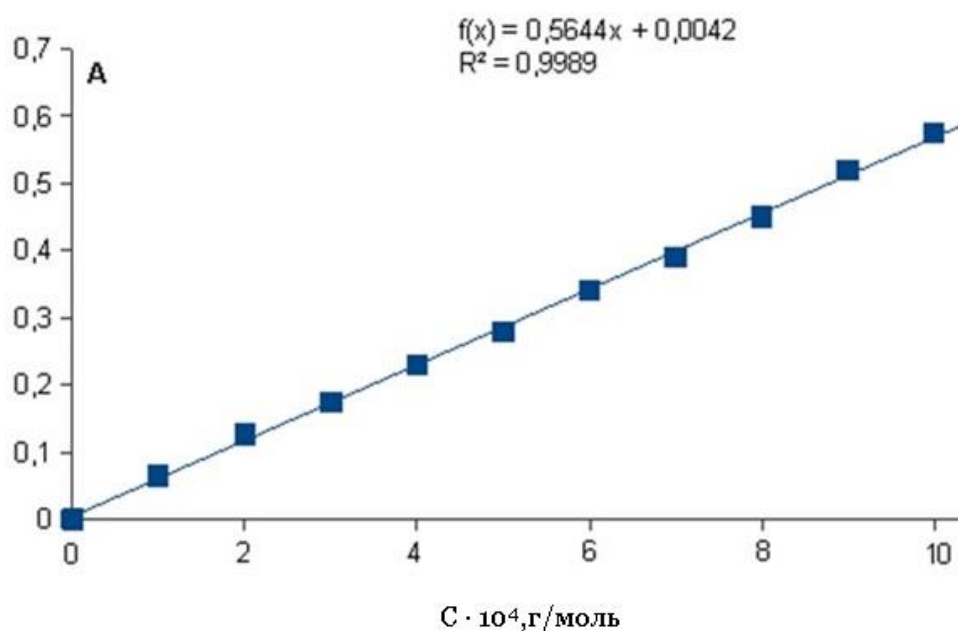


Рисунок 8 Градуировочная зависимость оптической плотности раствора глюкозы от ее концентрации в растворе

Общее содержание нейтральных сахаров, в пересчете на глюкозу, выраженное в процентах, представлено в таблице 1.

Таблица 1

Содержание нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу

№ образца	Abs	Содержание глюкозы, %
1. Коммерческий ксантан	0,450	$40,0 \pm 2,0$
2. Образец №1	0,664	$62,2 \pm 3,1$
3. Образец №8	0,876	$51,4 \pm 2,6$

Содержание нейтральных сахаров в пересчете на глюкозу в образце коммерческого ксанта́на оказалось меньше, чем заявлено производителем (не менее 50%), что может сказаться на качестве ксанта́на. В образцах полученных микробным синтезом, при разных условиях, содержание глюкозы выше 50%. Следовательно, образцы, полученные лабораторным способом, могут быть использованы в промышленности, так как соответствуют требованиям нормативных документов.

Таким образом, для количественного определения глюкозы в ксантане необходимо соблюдать следующие условия:

- свежеприготовленный раствор фенола 5% (в день эксперимента);
- свежеприготовленный стандартный раствор D-глюкозы (в день эксперимента);
- выдерживание образцов в избытке H_2SO_4 конц. в течение 45 минут;
- нахождение максимума пика поглощения $\lambda=485$ нм;
- необходимо учитывать разбавление исследуемых растворов, для того, чтобы величина оптической плотности сохранялась в диапазоне 0,2 – 1. Свыше $A = 1$ не соблюдается закон светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера.

3.2 Определение кислых сахаров в образцах ксантана карбазол-серным методом

При определении кислых сахаров в пересчете на галактуроновую кислоту в образце ксантана использовался карбазол-серный метод, основанный на цветной реакции карбазола с продуктами окисления моносахаров, образующихся после разрушения полимерных молекул концентрированной серной кислотой.

На рисунке 9 представлены наглядные УФ-спектры продуктов реакции, сформированных при действии карбазола на карбоксифурфурол.

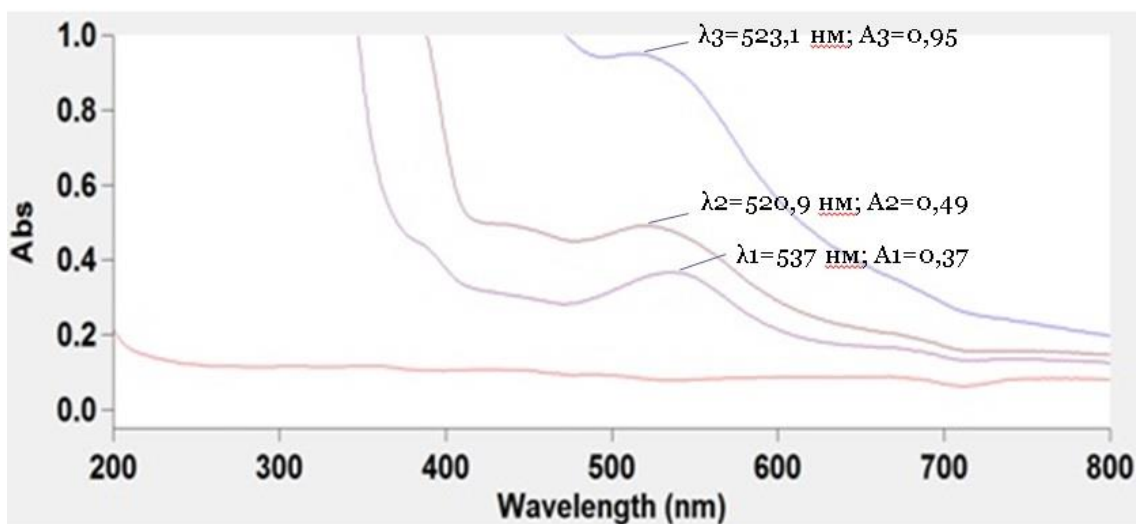


Рисунок 9 УФ-спектры поглощения продуктов реакции

Общее содержание галактуроновой кислоты в исследуемых образцах ксантана определяли по методу градуировочного графика.

На рисунке 10 представлен градуировочный график зависимости оптической плотности продуктов реакции от концентрации галактуроновой кислоты в растворе. Прямолинейная зависимость наблюдалась в области концентраций галактуроновой кислоты от 0,00013 до 0,0014 г/моль.

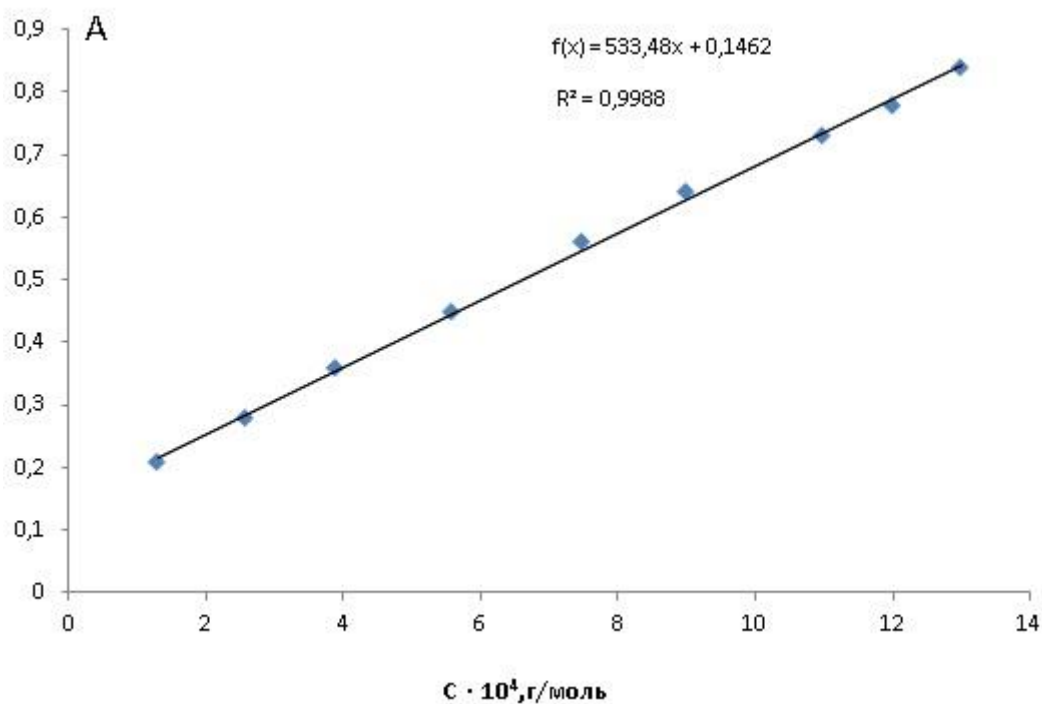


Рисунок 10 Зависимость оптической плотности продуктов реакции от концентрации галактуроновой кислоты в растворе

Общее содержание кислых сахаров в пересчете на галактуроновую кислоту, выраженное в процентах, представлено в таблице 2.

Таблица 2

Содержание кислых сахаров в пересчете на галактуроновую кислоту

№ образца	Abs	Содержание галактуроновой кислоты, %
1. Коммерческий ксантан	0,63	15,2 ± 1,6
2. Образец №1	0,24	13,3 ± 1,9
3. Образец №2	0,22	10,0 ± 2,0

Известно, что содержание галактуроновой кислоты в образце ксанта́на составляет от 5 до 40 %. Все исследуемые образцы соответствуют данному требованию, что позволяет использовать их в промышленности.

Таким образом, для количественного определения галактуроновой кислоты в ксантане необходимо соблюдать следующие условия:

- пробоподготовка ксантана: выдерживание образца на водяной бане, при температуре $36 - 38^{\circ}\text{C}$, в течение одного часа, для равномерного растворения;
- свежеприготовленный раствор карбазола 0,1% (в день эксперимента);
- введение раствора карбазола после инкубации пробирок на водяной бане.

Выводы

1. Подобраны рабочие условия определения глюкозы в образцах ксантана фенол-серным методом. Проведен расчет содержания нейтральных сахаров в образцах коммерческого ксантана и в образцах, полученных с помощью бактерии *Xanthomonas campestris*;

3. Подобраны рабочие условия определения кислых сахаров в пересчете на галактуроновую кислоту карбазол-серным методом. Проведен расчет содержания кислых сахаров в образцах коммерческого ксантана и в образцах, полученных с помощью бактерии *Xanthomonas campestris*;

4. В разделе «Социальная ответственность» оценены вредные факторы в аналитической лаборатории при выполнении НИР, а также предложены методы их устранения в соответствии нормативными документами.

5. В разделе «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» оценены потенциальные потребители результатов исследования, проведен анализ конкретных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения и оценен бюджет научного исследования с учетом выполнения проекта в течение одного года.

Список литературы

1. Хотимченко Ю.С. Фармакология некрахмальных полисахаридов / Хотимченко Ю.С., Ермак И. М. // Вестник ДВО РАН. – 2005. - №1. – С. 234-237.
2. Петрушевский В.В. Производство сахаристых веществ / Петрушевский В.В., Бондарь Е.Г., Винокурова Е.В. — К.: Урожай, 1989. — 168 с.
3. Кочетков Н.К. Химия природных соединений / Кочетков Н.К., Торгов И.В., Ботвиник М.М. — К.: Наука, 1960. — 561 с.
4. Зефилов Н.С. Химическая энциклопедия / Зефилов Н.С., Кулов Н.Н. — М.: Большая Российская энциклопедия, 1995. — 641 с.
5. Оводов, Ю. С. Биоорганическая химия, /Ю. Оводов // - 1998.-Т. 24, - №6. – с. 483-501.
6. Тюкавкина Н. А. Биоорганическая химия: учебник / Бауков Ю. И., Зурабян С. Э. // - 2010. - 416 с.
7. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук // - Новосибирск, - 1990.
8. Черных В.П. Органическая химия Том 3 — Х.: Основа, 1997. — 248 с.
9. Литвяк В.В. Атлас. Морфология крахмала и крахмалопродуктов / В.В. Литвяк – Минск: Беларус. навука, 2013. - 217с.
10. San-Land Young, Potentiometric titration studies on Xanthan Solution / Miriam Martino, Carlos Kienzle- Sterzer and J Antonio Torress // J Sci Food Agric - 1994, - 64, - p.121-127
11. Аркадьева З.А. Промышленная микробиология / Безбородое А.М., Блохина И.Н. // — М.: Высш. шк., 1989. — 688 с.
12. Cadmus M.C., Knutson C.A., Lagoda A.A., Pittsley J.E., Burton K.A. // Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermenters. Biotechnol. Bioeng. 2001. 20. P.1003 - 1014.

13. Li J., Jin H. (2007) Regulation of brassinosteroid signaling// Trends Plant Sci. 12, 37–41.
14. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956). Colometric method for determination of sugar and related substances// Analytical chemistry. 28(3), 350-356.
15. Scott R.W. Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials// Anal. Chem., 1979, 51 (7), pp 936–941 64.
16. Облучинская Е.Д., Минина С. А. Совершенствование способа получения экстракта из шрота фукусковых водорослей// Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 6. С. 36-39.
17. Kintner, P. K., Van Buren, J. P. (1982) J. Food Sci. 47, 756-776. 66.
18. Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids// J Biol Chemistry, 1947 Jan; 167(1):189-98.
19. Bitter T., Muir H. M. A modified uronic acid carbazole reaction// Anal Biochem 4:330-334 (1962).
20. Galambos, J. T. The reaction of carbazole with carbohydrates: I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars / J. T. Galambos // Anal. Biochem. 1967. - Vol. 19. - P. 119-132.
21. Tullia M.C. Colometric method for determination of sugar // Analytical chemistry. 1991. T.56, №8, P. 89 – 94.
22. Cuesta G., Suarez N., Bessio M.I., Ferreira F., Massaldi H. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method// J Microbiol Methods. 2003 Jan; 52(1):69-73.
23. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956). Colometric method for determination of sugar and related substances// Analytical chemistry. 28(3), 350-356.
24. Milner Y., Avigad G. The Milner-Avigad method for the quantitative determination of endouronidase activities// Carbohydr. Res. 4, pp. 359-361 (1967).

25. G.E. Anthon and D.M. Barret //Advances in Carbohydrate Chem., 13, p. 345.
26. S. Waffenschmidt, L. Jaenicke. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate// Anal Biochem., 165(2), pp. 337-340 (1987).
27. Filippov M. P., Chernei G. V. Determination of the content and degree of esterification of uronic acids in plant tissues and products of their processing// Prikl Biokhim Mikrobiol. 38(1), pp. 79-82, (2002).
28. Рысмухамбетова Г. Е., Экзополисахариды ксантомонад и клебсиелл: физико-химические, биологические свойства и перспективы применения, Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / - Саратов, - 2009.
29. Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений. Пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2011. 577 с.
30. Rochefort W.E., S. Middleman. Rheology of xanthan gum: salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. J. Rheol. 2007. N. 31. P. 337.
31. Milas, M., Rinando M. Conformational investigation of the bacterial polysaccharide xanthan. Carbohydr. Res. 2004. 76. P. 189 - 196.
32. Taylor, K.A. Anal.Biochem / Buchanan-Smith J.G. // - 1992. – 190-201.
33. Тенфорд, П.М. Физическая химия полимеров, - М., - “Химия”, - 1965.
34. Southwick, J.G. Solution studies of Xantan Gum Employing Quasielastic light Scattering / McDonnel M.E., Jamieson A.M., Blackwell J.// - 2014. – p. 145-156.
35. Шлегель, Г. Общая микробиология – 1987. - М.: Мир, - 567 с
36. Государственная Фармакопея XII, Общая Фармакопейная статья
37. Кабанов, В. А. Практикум по высокомолекулярным соединениям / под редакцией В. А. Кабанова // - “Химия”, - М., - 1985.

38. Березин, И.В., Основы биохимии / Савин Ю.В. // – М.: - Медицина, - 1990. - С. 130-165.
39. Rosalam S. and England R. // Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. Enzyme and Microbial Technology. 2006. V. 39. P. 197 - 207.
40. Pace G. W., Righelato R. C. // Production of extracellular microbial polysaccharides. Adv. Biochem. Eng. 2000. V. 15. P. 41- 70.
41. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий.
42. ГОСТ 12.1.003–83. Шум. Общие требования безопасности. 01.07.1984.- М.: Стандартинформ, 2008. – 13 с; СН 2.2.4/2.1.8.566-96
43. ГОСТ Р12.1.019-2009 Система стандартов безопасности труда.
44. Технический регламент «О требованиях пожарной безопасности» № 123-ФЗ от 22 июля 2008 год
45. ГОСТ 12.1.038 – 82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов.
46. Технический регламент «О безопасности средств индивидуальной защиты» №1213-ФЗ от 24.12.2009;
47. Трудовой кодекс Российской Федерации (Собрание законодательства Российской Федерации, 2002, N 1 (ч. I), ст. 3; 2004, N 35, ст. 3607; 2006, N 27, ст. 2878; 2008, N 30 (ч. II), ст. 3616), ПРИКАЗ от 12 апреля 2011 г. N 302н
48. Постановление от 30 мая 2003 г. N 114 «О введении в действие ГН 2.1.6.1338-03»
49. ГОСТ 14262-78. Кислота серная особой чистоты. Технические условия

50. ГОСТ Р 51723-2001. Спирт этиловый питьевой 95%-ный.
Технические условия

51. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение: учебно-методическое пособие /Криницына З.В., Видяев И.Г.; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2014. – 73 с.