

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФГБОУ ВО «АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

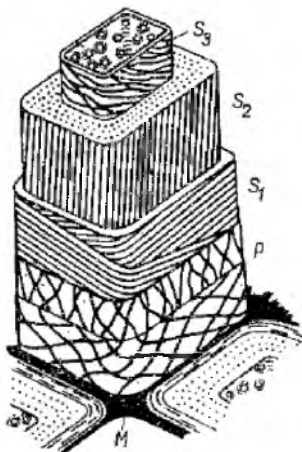
ФАКУЛЬТЕТ ХИМИИ

И ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

КАФЕДРА ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

(ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ)



Барнаул • 2019

Биотехнологическая переработка растительного сырья (лабораторный практикум) / М.Ю. Чепрасова, О.Г. Плешкова, Н.Г. Базарнова. – Барнаул, 2019. - 29 с.

Составители: Марина Юрьевна Чепрасова,
Ольга Геннадьевна Плешкова,
Наталья Григорьевна Базарнова
Ирина Владимировна Микушина
Сысоева Александра Викторовна

Лабораторный практикум предназначен для студентов дневного отделения, обучающихся по программе «Органическая химия» в рамках направления подготовки 04.04.01 Химия

Подписано в печать 28.05.2019.

Формат 60x84 1/16. Усл.-печ. л. 1,63.

Тираж 100 экз. Заказ 288.

Типография Алтайского государственного университета

656099 Барнаул, ул. Димитрова, 6б

СОДЕРЖАНИЕ

Содержание лабораторного практикума.....	5
Лабораторная работа 1. Выделение чистых культур из плодовых тел.....	7
Лабораторная работа 2. Термическая обработка образцов растительного сырья (подготовка субстрата для биотехнологического воздействия).....	8
Лабораторная работа 3. Нарботка биомассы мицелия гриба на зерновом субстрате.....	9
Лабораторная работа 4. Культивирование биомассы мицелия на растительном субстрате.....	10
Лабораторная работа 5. Определение влажности в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья.....	11
Лабораторная работа 6. Количественное определение лигнина с 72%-ной серной кислотой в модификации Комарова в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья.....	12
Лабораторная работа 7. Количественное определение целлюлозы азотно-спиртовым методом в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья.....	14
Лабораторная работа 8. Количественное определение легкогидролизуемых полисахаридов в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья.....	16
Лабораторная работа 9. Количественное определение трудногидролизуемых полисахаридов в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья.....	17
Лабораторная работа 10. Определение массовой доли редуцирующих веществ в гидролизатах по методу Макэна и Шоорля.....	19
Лабораторная работа 11. Характеризация структуры исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцов растительного сырья методом ИК-спектроскопии.....	22
Самостоятельная работа.....	25
Список литературы для подготовки к лабораторным работам.....	26

Список литературы, рекомендуемой при изучении дисциплины.....	27
Приложение	29

Содержание лабораторного практикума

Дисциплину «Теоретические основы химической переработки растительного сырья» в Алтайском государственном университете изучают магистры и аспиранты, обучающиеся по программе «Органическая химия» в рамках направления подготовки 04.04.01 «Химия».

Содержание лабораторного практикума нацелено на формирование у студентов представлений о современном состоянии и основных направлениях переработки методами биотехнологии растительного сырья, которые неразрывно связаны с химическими способами переработки.

В данном пособии приведены указания для проведения лабораторных работ.

Цели освоения лабораторного практикума

В данном практикуме на лабораторных работах студенты осваивают определение количественного химического состава в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья.

Целью освоения дисциплины является формирование знаний об основах безотходных технологий в производстве ферментативных добавок, технологиях получения белковых препаратов с помощью биотехнологических методов переработки растительного сырья, а также формировании умений и навыков работы с биологическими объектами.

Особенностью данной дисциплины является ее практическая направленность: значительная часть времени отводится на лабораторные работы, в процессе выполнения которых студенты, магистры и аспиранты овладевают навыками определения свойств растительного сырья и готовой продукции.

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины

Изучение данной учебной дисциплины направлено на формирование у обучающихся профессиональных (ПК) компетенций:

Требования к результатам освоения учебной дисциплины

№ п/п	Содержание компетенции (или её части)
1	готовность применять основные принципы рационального использования природных ресурсов и защиты окружающей среды
2	способность использовать глубокие специализированные профессиональные теоретические и практические знания для проведения исследований, на основе моделирования химических, биохимических, физико-химических, микробиологических и биотехнологических процессов, протекающих при биотехнологической переработке растительного сырья
3	способность научно обосновывать разработку и создавать новые продукты переработки растительного сырья для решения научных и практических задач

В результате изучения учебной дисциплины обучающиеся должны:		
знать	уметь	владеть
подходы к созданию безотходных и малоотходных технологий при переработке растительного сырья методами биотехнологии	использовать полученные знания для создания безотходных и малоотходных технологий при переработке растительного сырья методами биотехнологии	методиками подбора оборудования и выбора технологий, обеспечивающих биотехнологическую переработку растительного сырья
основные химические и биотехнологические процессы	использовать теоретические и практические знания для проведения исследований химических и биотехнологических процессов	основами моделирования технологических процессов на основе анализа биотехнологических превращений структурных компонентов сырья
теоретические основы и методы химической и биотехнологической переработки растительного сырья	проводить оценку существующих технологий и их модернизацию на предмет создания новых продуктов	способностью выбирать оптимальные решения для разработки и создания новых продуктов

Лабораторная работа 1. Выделение чистых культур из плодовых тел

Необходимые реактивы и материалы. Плодовое тело гриба *Pleurotus ostreatus* 2 шт, 70%-ный водный раствор этанола (100 мл), вода дистиллированная (500 мл), фильтровальная бумага синяя лента 5 шт, диаметр 180 мм.

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Ламинар-бокс Neoteric (221.120), пробирки культуральные без пробки (20×200) объемом 15 мл (5 шт), спиртовка лабораторная, скальпель, инокуляционная игла.

Методика анализа. Выделение чистой мицелиарной культуры необходимо проводить из плодовых тел гибридных штаммов. Для этого следует выбрать молодые неповрежденные плодовые тела. Шляпка диаметром 5—15 см, мясистая, сплошная, округлая, с тонким краем; форма уховидная или почти круглая. У молодых грибов шляпка выпуклая и с завернутым краем. Поверхность шляпки гладкая, глянцевая, часто волнистая. При произрастании во влажных условиях шляпка гриба часто покрыта мицелиальным налётом. Цвет шляпки тёмно-серого или пепельно-серого оттенка. Ножка короткая, плотная, сплошная, часто изогнутая, 2—5 см длиной и 0,8—3 см толщиной. Поверхность ножки белая, гладкая. Проводить выделение лучше в день сбора.

Плодовое тело кладут на фильтровальную бумагу, разламывают и из середины (в месте перехода ножки в шляпку) стерильным скальпелем отрезают кусочки ткани размером 0,5-1 см, каждый кусочек накалывают стерильной инокуляционной иглой, и осторожно, над пламенем горелки, переносят в пробирки на питательную среду¹. В каждую пробирку помещают только один кусочек, что важно для предотвращения заражения. Пробирки с инокулюмом помещают в термостат при температуре 24-26 °С. Примерно через двое суток кусочки плодового тела в пробирках опускаются растущим мицелием.

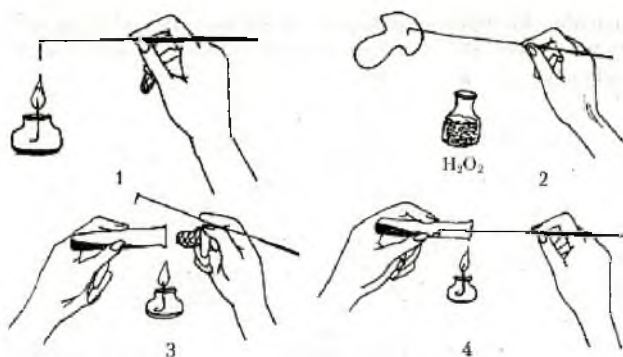


Рисунок – 1. Схема выделения чистых культур из плодовых тел

Лабораторная работа 2. Термическая обработка образцов растительного сырья (подготовка субстрата для биотехнологического воздействия).

Необходимые материалы и реактивы. Предварительно промытые образцы воздушно-сухих околоплодных оболочек подсолнечника(лузги), (250 г), предварительно промытые образцы воздушно-сухой соломы пшеницы в виде частиц длиной 2 см (250 г), предварительно промытые нефракционированные воздушно-сухие образцы опилок древесины осины (250 г), вода дистиллированная (1000 мл).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Реакционная емкость (эмалированная кастрюля) вместимостью 1000 мл, металлическая ложка объемом 18 мл, мерный цилиндр на 250 мл, электрическая плитка с терморегулятором, вытяжной шкаф.

Методика анализа. Навеску растительного сырья – субстрата массой 250 г взвешивают на теххимических весах с точностью до 0,05 г, промывают проточной водой, в конце промывают дистиллированной водой, помещают в реакционную емкость – эмалированную кастрюлю, добавляют 750 мл дистиллированной воды и доводят до кипения на электрической плитке. Субстрат пастеризуют при температуре 75-85 °С в течении 6-8 часов. После пастеризации реакционную массу выдерживают 24 часа в вытяжном шкафу.

Лабораторная работа 3. Нарботка биомассы мицелия гриба на зерновом субстрате

Необходимые реактивы и материалы. Мицелий гриба *Pleurotus ostreatus*, зерно пшеницы (1 кг), 70%-ный водный раствор этанола (100 мл), вода дистиллированная (2000 мл).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Реакционная емкость (эмалированная кастрюля) вместимостью 2000мл, теххимические весы, автоклав настольный Тюмень МедиКо ГК-25, ламинар-бокс Neoteric (221.120), плитка электрическая с терморегулятором, мерный цилиндр 250 мл, пластиковое сито, колбы Эрленмейера на 750 мл, пробки ватно-марлевые, пергамент, чашки Петри (6 шт), спиртовка лабораторная, микробиологическая петля.

1. Навеску зерна пшеницы массой 1 кг взвешивают на теххимических весах с точностью до 0,05 г, промывают проточной водой, в конце промывают дистиллированной водой, помещают в реакционную емкость – эмалированную кастрюлю, добавляют 1500 мл дистиллированной воды и доводят до кипения на электрической плитке. После закипания выдерживают в течение 15 минут при более низкой температуре, затем зерно отбрасывают на сито. После того, как отойдет пар, расфасовывают в колбы Эрленмейера по 250 г при помощи металлической ложки, предварительно обработанной 70%-ным водным раствором этанола. Закрывают ватно-марлевыми пробками, накрывают пергаментом и плотно закрепляют его канцелярской резинкой.

2. Колбы с зерном помещают в настольный автоклав. Стерилизацию проводят в течение 45 минут при давлении 1 атмосфера и температуре 121°С.²

3. После стерилизации колбы с зерном выдерживаются сутки в ламинар-боксе.

4. Инокуляцию проводят следующим образом: мицелий разрезают на 4 части стерильной инокуляционной иглой и вносят через пламя спиртовки в каждую колбу на зерновой субстрат. Колбы с субстратами после инокуляции закрывают теми же пробками, подвергнутыми обеззараживанию.

Обеззараживание пробок осуществляют проведением края пробки через пламя горелки.

5. На колбе с посевом обязательно записывают дату инокуляции, номер штамма. Колбы с зерном хранят до полного их обростания мицелием в течение 14 суток в климатической камере при температуре 15-16 °С.

Используется мицелий, предварительно выращенный в лабораторной работе №0.

Лабораторная работа 4. Культивирование биомассы мицелия на растительном субстрате

Необходимые реактивы и материалы. Мицелий гриба *Pleurotus ostreatus*, получен в лабораторной работе №1 (смесь зерна и мицелия), предварительно промытая и стерилизованная биомасса околоплодной оболочки подсолнечника (100 г), предварительно промытые и стерилизованные образцы соломы пшеницы в виде частиц длиной 2 см (100 г), предварительно промытые и стерилизованные нефракционированные опилки древесины осины (100 г).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Реакционная емкость (эмалированная кастрюля) вместимостью 1000 мл, металлическая ложка объемом 18 мл, латексные перчатки, 70%-ный водный раствор этанола (100 мл), фасовочные полиэтиленовые пакеты 3 шт (20×30 мм), скальпель.

1. Используют предварительно подготовленный растительный субстрат из лабораторной работы №1 (влажность 70-75%). Субстрат помещают в реакционную емкость – эмалированную кастрюлю. Готовый посевной мицелий из колбы Эрленмейера, в объеме 5% от общей массы субстрата, вносят в реакционную емкость и перемешивают. Перемешивание осуществляют металлической ложкой заранее обработанной спиртом.

2. Смесь субстрата с мицелием расфасовывают при помощи металлической ложки, предварительно обработанной 70%-ным водным раствором этанола, в фасовочные полиэтиленовые пакеты в ламинар-боксе.

3. Инкубирование проводят в климатической камере при температуре 14-16°С с влажностью 85-90% до полного обрастания субстрата мицелием в течение 14 суток.

4. В субстратах до и после биотехнологической обработки через 14-ые и 30-ые сутки после посева определяют содержание лигнина, целлюлозы и полисахаридов.

Лабораторная работа 5. Определение влажности в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья

Необходимые реактивы. Используются смеси субстратов с мицелием полученные в лабораторной работе №3, стерилизованная околоплодная оболочка подсолнечника (100 г), стерилизованные образцы соломы пшеницы в виде частиц длиной 2 см (100 г), стерилизованные нефракционированные опилки древесины осины (100 г).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Технохимические весы лабораторные ВЛТЭ-1100, анализатор влажности МХ-50

Методика анализа. Древесина и выделенные из нее компоненты гигроскопичны и в воздушно-сухом состоянии содержат определенное количество гигроскопической воды в равновесии с влажностью воздуха. В растительном субстрате определяют влажность (относительную влажность) образца в отдельных параллельных пробах (не менее двух) и рассчитывают по ней *коэффициент сухости* $K_{\text{сух}}$, показывающий относительное содержание в пробе абсолютно сухого материала. От правильного определения влажности зависит точность всех химических анализов.

Навеску анализируемого субстрата 1 г взвешивают на технохимических весах с точностью до 0,01 г и помещают в чашу анализатора влажности МХ-50.

Порядок работы на анализаторе влажности

1. Включите прибор в сеть. Нажмите клавишу RESET для обнуления дисплея перед началом каждого измерения.

2. Перед началом измерений анализатор необходимо прогреть. При повторных или непрерывных измерениях образцов первый результат всегда отличается от последующих результатов.

3. Перед началом измерений убедитесь, что значение веса пробы на дисплее стабильно. Для начала измерений нажмите клавишу START.

4. Для завершения измерения выберите нужный режим анализа. В качестве контрольного значения используйте величину изменения содержания влаги в минуту [%/мин], выведенную на дисплей.

5. Процедура прогрева следующая: поместите в прибор пустую чашку для образца, нажмите клавишу START для начала прогрева. Температура анализатора уравнивается.

6. Поместите пробу на чашку для образца, охлажденную до комнатной температуры. Если поместить пробу на горячую чашку, влага начнет рассеиваться до начала измерений. В этом случае точные измерения невозможны. Рекомендуется использовать несколько чашек для образцов при проведении параллельных измерений.

7. Во время измерений не складывайте чашки друг на друга

Лабораторная работа 6. Количественное определение лигнина с 72%-ной серной кислотой в модификации Комарова в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья.

Необходимые реактивы и материалы. Анализируемая проба растительного сырья массой около 5 г, 72%-ная серная кислота H_2SO_4 (плотностью 1,64 г/мл) объемом 15 мл, дистиллированная вода 500 мл, 1%-ный раствор метилового оранжевого (25 мл).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Конические колбы вместимостью 50 мл с притертой пробкой, конические колбы вместимостью 500 мл, мерный цилиндр объемом 25 мл, мерный цилиндр объемом 250 мл, стеклянная палочка с резиновым наконечником, обратный холодильник,

электрическая плитка с терморегулятором, фильтры Шотта с пористостью ПОР 100 (3 шт), колба Бунзена.

Методика анализа. Навеску субстрата массой около 1 г помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой. Влажность субстрата определяют при помощи анализатора влажности МХ-50. К навеске добавляют 15 мл 72%-ной H_2SO_4 (плотностью 1,64 г/мл) и выдерживают в термостате при температуре 24...25°C в течение 2,5 ч при периодическом осторожном помешивании во избежание образования комков. Затем смесь лигнина с кислотой переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл, смывая лигнин 200 мл дистиллированной воды. При этом можно пользоваться стеклянной палочкой с резиновым наконечником. Разбавленную смесь кипятят с обратным холодильником на электрической плитке (слабое кипение) в течение 1 ч. Частицам лигнина дают укрупниться и осесть. Затем лигнин отфильтровывают на стеклянном пористом фильтре, высушенном до постоянной массы. Фильтрование рекомендуется проводить на следующий день. При проведении параллельных и серийных анализов фильтрование следует проводить через строго определенный промежуток времени. Мелкодисперсные лигнины (лиственные и др.) фильтруют через стеклянный фильтр с пористостью ПОР 100. Начинать фильтрование рекомендуется без отсоса. Сначала на фильтр сливают отстоявшуюся жидкость, а затем начинают переносить осадок. Окончательно переносят осадок лигнина из колбы на фильтр с помощью горячей воды, добавляя ее малыми порциями, при промывке. При замедлении фильтрования подключают водоструйный насос, но при этом не следует отсасывать осадок на фильтре досуха. Необходимо оставлять слой воды перед добавлением каждой новой порции фильтруемой жидкости. После промывки от кислоты (по индикатору метиловому оранжевому) отсасывают жидкость полностью.

Для установления конца промывки каплю жидкости, стекающей с фильтра, наносят на фильтровальную бумагу и добавляют каплю индикатора. Если последний не менял цвета, промывку считают законченной.

Фильтр с лигнином сушат в сушильном шкафу при температуре $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ до постоянной массы и взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,0001 г.

Массовую долю лигнина, % к абсолютно сухому исходному субстрату, рассчитывают по формуле

$$L = \frac{m_1 - m}{g} K_{\text{Э}} \cdot 100$$

где m_1 — масса фильтра с лигнином, г; m — масса пустого фильтра, г; g — масса абсолютно сухой навески субстрата, г; $K_{\text{Э}}$ — коэффициент экстрагирования органическим растворителем.

Разность между результатами двух параллельных определений не должна превышать 0,5%.

Лабораторная работа 7. Количественное определение целлюлозы азотно-спиртовым методом в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья

Необходимые реактивы и материалы. Анализируемая проба растительного сырья массой около 5 г, концентрированная азотная кислота HNO_3 (плотность 1,4 г/мл) объемом 25 мл, 95%-ный этанол 100 мл, дистиллированная вода 250 мл, раствор солянокислого флороглюцина (10 мл), 1%-ный раствор метилового оранжевого (25 мл).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Конические колбы на 250 мл, мерный цилиндр объемом 25 мл, стеклянная палочка с резиновым наконечником, обратный холодильник, электрическая плитка с терморегулятором, фильтры Шотта с пористостью ПОР 100 (3 шт), колба Бунзена.

Методика анализа. Для анализа используют азотно-спиртовую смесь, состоящую из одного объема концентрированной азотной кислоты (плотностью 1,4 г/мл) и четырех объемов 95%-ного этанола.

Навеску субстрата массой около 1 г помещают в коническую колбу на

250 мл и добавляют мерным цилиндром 25 мл азотно-спиртовой смеси. К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят навеску со смесью на водяной бане в течение 1 ч. Нельзя допускать слишком бурного кипения во избежание выбрасывания целлюлозной массы в холодильник и разбрасывания по стенкам колбы. После окончания кипячения навески дают осесть и осторожно сливают жидкость через высушенный до постоянной массы стеклянный пористый фильтр. Попавшие на фильтр опилки смывают обратно в колбу, используя 25 мл свежей азотно-спиртовой смеси, и снова кипятят в колбе с обратным холодильником в течение 1 ч. Такую обработку проводят три-четыре раза. После третьей обработки делают пробу на полноту делигнификации и решают, нужно или нет продолжить обработку. Признаком конца делигнификации служит отсутствие красного окрашивания при действии на пробу целлюлозы (несколько волокон) солянокислого раствора флороглюцина. Присутствие лигнина обнаруживается по оранжево-желтому окрашиванию.

После последней обработки целлюлозу отфильтровывают на высушенном до постоянной массы стеклянном пористом фильтре, применяя отсос, промывают 10 мл свежей азотно-спиртовой смеси, а затем горячей водой. При промывке тщательно смывают всю целлюлозу из колбы на фильтр. Отмывку от кислоты проверяют по индикатору метиловому оранжевому, нанося каплю его раствора из капельницы на целлюлозу в фильтре. В присутствии кислоты индикатор принимает красноватый оттенок. В этом случае промывку продолжают. Если индикатор не изменяет цвета, промывку считают законченной. Индикатор смывают горячей водой и тщательно ее отсасывают. Фильтр с целлюлозой сушат в сушильном шкафу при температуре $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ до постоянной массы и взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,0001 г.

Массовую долю «сырой» целлюлозы, % к абсолютно сухой древесине, рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{m_1 - m}{g} \cdot 100,$$

где m_1 — масса фильтра с целлюлозой, г; m — масса пустого фильтра, г; g — масса абсолютно сухой навески древесины, г.

Расхождение между результатами двух параллельных определений не должно превышать 1,0%.

Лабораторная работа 8. Количественное определение легкогидролизуемых полисахаридов в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья

Необходимые реактивы и материалы. Анализируемая проба растительного сырья массой около 15 г, 2%-ная соляная кислота HCl (200 мл), дистиллированная вода (250 мл), 1%-ный раствор метилового оранжевого (25 мл).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Конические колбы вместимость 500 мл, мерный цилиндр объемом 250 мл, обратный холодильник, электрическая плитка с терморегулятором, стеклянная палочка с резиновым наконечником, мерная колба с притертой пробкой на 500 мл, воронка Бюхнера, колба Бунзена, фильтровальная бумага синяя лента 5 шт.

Методика анализа. Навеску субстрата массой около 5 г помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, добавляют 200 мл 2%-ной HCl и кипятят (слабое кипение) с обратным холодильником на электрической плитке в течение 3 ч. Для регулирования кипения под колбу подкладывают асбестовую сетку. Все опилки должны находиться в кислоте. Для этого после разогрева содержимое колбы осторожно перемешивают. По окончании гидролиза отфильтровывают опилки на воронку Бюхнера с бумажным фильтром с отсосом. Остаток на фильтре промывают горячей водой до отрицательной реакции на кислоту по индикатору метиловому оранжевому и используют для определения трудногидролизуемых полисахаридов. Фильтрат и промывные воды переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят раствор после

охлаждения дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. В полученном растворе определяют массовую долю редуцирующих веществ в процентах.

Массовую долю легкогидролизуемых полисахаридов, % к абсолютно сухой навески, рассчитывают по формуле:

$$X_{\text{Л}} = \frac{c_{\text{Л}} V k_{\text{Л}}}{g 100},$$

где $c_{\text{Л}}$ — массовая доля ПВ в гидролизате легкогидролизуемых полисахаридов, %; V — объем гидролизата, $V=500 \text{ см}^3$; $k_{\text{Л}}$ — коэффициент пересчета моносахаридов в полисахариды; g — масса абсолютно сухой навески субстрата, г.

Лабораторная работа 9. Количественное определение трудногидролизуемых полисахаридов в исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцах растительного сырья

Необходимые реактивы и материалы. Анализируемая проба растительного сырья массой около 15 г, 80%-ная серная кислота H_2SO_4 объемом 40 мл, дистиллированная вода 1000 мл, 20%-ный водный раствор NaOH объемом 25 мл, 1%-ный водный раствор метилового оранжевого (25 мл).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Стеклоанный стакан вместимостью 100 мл, коническая колба вместимостью 1000 мл, мерный цилиндр объемом 250 мл, обратный холодильник, электрическая плитка с терморегулятором, стеклянная палочка с резиновым наконечником, воронка Бюхнера, колба Бунзена, стеклянная пипетка объемом 25 мл, мерная колба вместимостью 100 мл, фильтровальная бумага синяя лента 5 шт.

Методика анализа. Остаток навески после гидролиза легкогидролизуемых полисахаридов и промывки количественно переносят с фильтра в стакан вместимостью 100 мл и подсушивают при $50\text{-}60^\circ\text{C}$ примерно до воздушно-сухого состояния, а затем обрабатывают 35-40 мл 80%-ной H_2SO_4

при комнатной температуре в течение 3 ч, периодически перемешивая стеклянной палочкой. Смесь из стакана количественно переносят в коническую колбу вместимостью 1000 мл, смывая дистиллированной водой в количестве 600 мл. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят (слабое кипение) на электрической плитке в течение 3 ч. После окончания дополнительного гидролиза фильтруют раствор через воронку Бюхнера с бумажным фильтром с отсосом. Остаток на фильтре промывают небольшими порциями горячей воды до отрицательной реакции на кислоту по индикатору метиловому оранжевому. Фильтрат и промывные воды переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл. После охлаждения доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Из полученного раствора отбирают пипеткой 50 мл в мерную колбу на 100 мл и осторожно (по каплям) при постоянном перемешивании нейтрализуют 20%-ным раствором NaOH по метиловому оранжевому. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой. В нейтрализованном растворе определяют концентрацию редуцирующих веществ.

Массовую долю трудногидролизуемых полисахаридов, % к абсолютно сухому субстрату, рассчитывают по формуле:

$$X_T = \frac{c_T V n k_r}{g \cdot 100} \cdot 100,$$

где c_T — массовая доля РВ в разбавленном нейтрализованном гидролизате, %; V — общий объем кислого гидролизата, $V = 1000 \text{ см}^3$; n — разбавление гидролизата при нейтрализации, $n = 100/50 = 2$; k_r — коэффициент пересчета моносахаридов в полисахариды, равный 0,90; g — масса абсолютно сухой навески субстрата, г.

Коэффициент пересчета берут равным 0,90, поскольку основным сахаром в гидролизате трудногидролизуемых полисахаридов является глюкоза.

Лабораторная работа 10. Определение массовой доли редуцирующих веществ в гидролизатах по методу Макэна и Шоорля

Необходимые реактивы и материалы. Сульфат меди пятиводный $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (69,3 г), сегнетова соль $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (346 г), гидроксид натрия NaOH (100 г), раствор тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ с концентрацией 0,1 моль/л, 1%-ный раствор крахмала (10 мл), дистиллированная вода 2500 мл, 25%-ный раствор серной кислоты H_2SO_4 (10 мл), водный раствор йодида калия KI (10 мл: 3 г в 10 мл).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Конические колбы вместимостью 250 мл, мерный цилиндр объемом 250 мл, электрическая плитка с терморегулятором, градуированная пипетка объемом 10 мл, стеклянная бюретка для титрования с краном.

Методика анализа. Для получения реактива Фелинга готовят два раствора А — 69,3 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл водного раствора; Б — 346 г сегнетовой соли и 100 г NaOH в 1000 мл водного раствора.

В коническую колбу вместимостью 250 мл вливают пипеткой 10 мл раствора А, затем 10 мл раствора Б и 20 мл гидролизата легкогидролизуемых полисахаридов (в случае неразбавленного гидролизата — 10 мл) или нейтрализованного гидролизата трудногидролизуемых полисахаридов. Смесь разбавляют дистиллированной водой до общего объема 50 мл и хорошо перемешивают. Ставят колбу на горячую включенную электроплитку, нагревают смесь до кипения в течение 3 мин и кипятят точно 2 мин (по секундомеру), считая с момента появления первого пузырька на поверхности раствора. Кипение должно быть умеренным, чтобы объем жидкости в колбе оставался примерно постоянным. Для уменьшения испарения в горло колбы вставляют маленькую конусообразную стеклянную воронку. При недостатке реактива Фелинга, о чем свидетельствует исчезновение синей окраски раствора после кипячения, объем пробы гидролизата уменьшают, добавив при разбавлении соответствующий объем воды.

По окончании кипячения колбу быстро охлаждают холодной водой до

25°C, добавляют раствор KI (3 г KI в 10 мл воды) и 10 мл 25%-ной H₂SO₄ и сразу же при непрерывном перемешивании титруют выделившийся йод раствором тиосульфата натрия концентрацией (Na₂S₂O₃) 0,1 моль/л до перехода коричневой окраски в светло-желтую. Затем добавляют 10 мл 0,5-1%-ного раствора крахмала и медленно дотитровывают раствор до полного исчезновения синей окраски. Раствор остается окрашенным в кремовый цвет вследствие образования иодида меди (I). В аналогичных условиях, но без добавления раствора сахара, проводят контрольный опыт. По разности расходов раствора Na₂S₂O₃ в контрольном и рабочем опытах, а, мл, с помощью эмпирической таблицы (таблица 1) находят количество сахара в пробе гидролизата, взятой на анализ, b, мг.

При анализе трудногидролизуемых полисахаридов расчет ведут на глюкозу, а при анализе гидролизата легкогидролизуемых полисахаридов - на ксилозу и маннозу.

Затем рассчитывают массовую долю редуцирующих веществ в гидролизате c_d или c_r , %, по формуле:

$$c = \frac{b \cdot 100}{v \cdot 1000},$$

где b — количество сахара в пробе гидролизата объемом v, см³ (20 или 10 см³), найденное по таблице, мг.

Таблица 1 — соотношение меди, глюкозы, маннозы и ксилозы, мг, для анализа РВ по методу Макэна и Шоорля

Разность расхода 0,1 моль/дм ³ раствора Na ₂ S ₂ O ₃ , а см ³	Медь	Глюкоза, а		Манноза, ксилоза, b	
1	6,4	3,2		3,1	
2	12,7	6,3	3,1	6,3	3,2
3	19,1	9,4	3,1	9,5	3,2
4	25,4	12,6	3,2	12,8	3,3
5	31,8	15,9	3,3	16,1	3,3
6	38,1	19,2	3,3	19,4	3,3
7	44,5	22,4	3,2	22,8	3,4
8	50,9	25,6	3,2	26,2	3,4
9	57,3	28,9	3,3	29,6	3,4
10	63,6	32,3	3,4	33,0	3,4
11	70,0	35,7	3,4	36,5	3,5
12	76,3	39,0	3,3	40,0	3,5
13	82,7	42,4	3,4	43,5	3,5
14	89,1	45,8	3,4	47,0	3,5
15	95,4	49,3	3,5	50,6	3,6
16	101,8	52,8	3,5	54,2	3,6
17	108,1	56,3	3,5	57,9	3,7
18	114,4	59,8	3,5	62,6	3,7
19	120,8	63,3	3,5	65,3	3,7
20	127,2	66,9	3,6	69,2	3,9
21	133,5	70,7	3,8	73,1	3,9
22	139,8	74,5	3,8	77,0	3,9
23	146,2	78,5	4,0	81,0	4,0
24	152,6	82,6	4,1	85,0	4,0
25	159,0	86,6	4,0	89,0	4,0

Примечание. Для проведения интерполяции в правой половине каждой колонки приведена разность масс сахара, соответствующая увеличению объема из расходуемого на титрование раствора тиосульфата натрия на 1 см³. Если на титрование израсходовано дробное число см³ раствора тиосульфата натрия, то при расчете производят интерполяцию с использованием приведенных разностей.

Лабораторная работа 11. Характеризация структуры исходных и подвергнутых биотехнологической обработке образцов растительного сырья методом ИК-спектроскопии.

Необходимые реактивы. Бромид калия (особо чистый) массой 100 мг.

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Спектрометр InfracumFT-801, пресс гидравлический ручной ППР-400, агатовые ступка и пест диаметром 60 мм, объем 24 мл, сушильный шкаф, ИК-лампа, бюксы стеклянные с крышкой объемом 15 мл 20 шт, аналитические весы с точностью до 0,0001 г

Методика анализа.

1. Образцы готовят следующим образом: 5 мг анализируемого продукта и 495 мг высушенного в сушильном шкафу КВг (осч) тщательно растирают пестом в агатовой ступке под ИК-лампой в течение 25-30 минут.

2. Полученный 1%-й твердый раствор анализируемого продукта в КВг, прессуют в таблетки при помощи гидравлического пресса под давлением 10 атм.

3. Регистрацию спектров осуществляют на спектрометре InfracumFT-801 в интервале частот $4000-400 \text{ см}^{-1}$. Полученные ИК-спектры анализируют по полосам поглощения.

¹Приготовление овсяного отвара агаризованного (ООА)

Необходимые реактивы и материалы. Зерно овса (135 г), вода дистиллированная (1700 мл).

Лабораторная посуда, приборы и оборудование. Реакционная емкость (эмалированная кастрюля) вместимостью 2000мл, теххимические весы, автоклав настольный Тюмень МедиКо ГК-25, плитка электрическая с

терморегулятором, мерный цилиндр 250 мл, пластиковое сито, флаконы медицинские объемом 500 мл 3 шт, пробки ватно-марлевые, пергамен, канцелярские резинки.

1. Навеску зерна овса массой 135 г взвешивают на технохимических весах с точностью до 0,05 г, промывают проточной водой, в конце промывают дистиллированной водой, помещают в реакционную емкость – эмалированную кастрюлю, добавляют 1700 мл дистиллированной воды и доводят до кипения на электрической плитке. После закипания выдерживают в течение 1,5 часа при более низкой температуре. После пастеризации реакционную массу выдерживают 24 часа в вытяжном шкафу.

2. На следующие сутки отвар отфильтровывают через сито и разливают в объеме 250 мл во флаконы объемом 500 мл. Во флаконы заранее рассыпают агар массой 4 г на 1 флакон. Закрывают ватно-марлевыми пробками, накрывают пергаментом и плотно закрепляют его канцелярской резинкой.

3. Флаконы с питательной средой помещают в настольный автоклав. Стерилизацию проводят в течение 45 минут при давлении 1 атмосфера и температуре 121°С.²

²Инструкция по эксплуатации настольного автоклава Тюмень МедиКо ГК–25

1. Работа стерилизатора начинается с включения вилки электрического шнура в розетку.

2. В стерилизационную камеру заливают дистиллированную воду по порог в объеме 2-3 литров.

3. В лотках размещают в один слой стерилизуемые изделия.

4. Закрывают дверь. Для этого, при плотно прижатой двери, ручкой введут затвор в зацепление с осью. Зацепление выполняется до упора.

5. После нажатия кнопки «Пуск» на боковой панели стерилизатора, включают кнопку 2 (подача воды в парогенератор) и ждут 8 минут, чтобы вода заполнила парогенератор. После отключают кнопку 2.

6. Включают кнопку 4 (нагрев), когда давление в парогенераторе достигает 1,2 атм (значение смотрят на электроконтактном манометре) включают кнопку 3 (подача пара в камеру).

7. Необходимо подождать в течение 5-7 минут, затем приоткрыть шаровой кран, расположенный на задней панели стерилизатора и начать продувку камеры, для этого включить кнопку 1 (сброс пара с камеры) на 10-20 секунд. Продувку повторить 5-6 раз.

8. Начинается этап – стерилизация. На этом этапе в стерилизационной камере поддерживается температура 118-121 °С и давление 1,2 амт. Стерилизация проводится в течение 35-45 минут.

9. По завершению стерилизационного цикла необходимо отключить кнопки 4 и 3.

10. Включить кнопку 1 и соблюдая осторожность приоткрыть кран 1 на задней панели стерилизатора. Происходит выпуск пара из стерилизационной камеры и выравнивание давления до атмосферного.

11. После необходимо нажать кнопку «Стоп», соблюдая осторожность приоткрыть дверь и произвести сушку простерилизованных предметов естественным путем в стерилизационной камере с приоткрытой дверью в течение 10 минут. После сушки производят разгрузку стерилизованных предметов.

Самостоятельная работа

Подготовка к лабораторным работам включает следующие этапы:

1. Освоение сути фрагмента теоретических основ химических и биотехнологических методов, применяемых в данной лабораторной работе.
2. Подготовка плана работы, который должен быть детально составлен в соответствии с методикой лабораторной работы и зафиксирован в рабочем журнале.
3. Выяснение химических и биотехнологических процессов и написание реакций, лежащих в основе всех процессов, проводимых при осуществлении методов анализа.
4. Получение студентом допуска к работе на собеседовании с преподавателем

По итогам лабораторных работ студент обязан выполнить следующее:

- Подготовить отчеты по лабораторным работам (в отчете по лабораторной работе фиксируются все записи, касающиеся промежуточных и конечных результатов анализа, данные о выходе продукта до и после биотехнологической переработки, результаты титрований и т.д.). Образец оформления лабораторной работы представлен в приложении.
- Подготовить сообщение по результатам выполненной лабораторной работы и материалы, для опубликования в журнале «Химия растительного сырья» в соответствии с требованиями для авторов журнала (<http://www.chem.asu.ru/chemwood/pravila.php>).

Список литературы для подготовки к лабораторным работам

1. Базарнова, Н.Г. Химические превращения древесины в реакциях О-алкилирования и О-этерификации: Дис. докт. хим. наук: 05.21.03 / Н.Г. Базарнова. – Красноярск, 1999. – 380 с.
2. Маркин В.И. Исследование карбоксиметилирования древесины суспензионным способом: Дис. канд. хим. наук. – Красноярск, 1999. – 159 с.
3. Калюта Е. В. Молекулярно-массовые характеристики эфиров целлюлозы, полученные при карбоксиметилировании и нитровании древесины: дис. канд. хим. наук: 05.21.03 / Калюта Е. В. – Красноярск, 2007. – 141 с.
4. Базарнова Н. Г. Методы исследования древесины и ее производных: учебное пособие / Н. Г. Базарнова, Е. В. Карпова, И. Б. Катраков. – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2002. – 160 с.
5. Биоконверсия растительного сырья: учебное пособие. А.И. Машанов, Н.А. Величко, Е.Е. Ташлыкова. Красноярск: Красноярский ГАУ, 2014. 223 с.
6. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. I. Древесина и разрушающие ее грибы. / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, В.И. Кондращенко; [Отв. ред. А.М. Безбородов]. – М.: Наука, 2001. – 264 с.
7. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка / Бисько Н.А., Дудка И.А. – Киев: Наук.думка, 1987. – 148 с.
8. Оболенская А. В., Ельницкая З. П., Леонович А. А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: Учебное пособие для вузов.—М.: «Экология», 1991.—320 с.

Список литературы, рекомендуемой при изучении дисциплины

1. Зарубин М.Я. Основы органической химии лигнинов / М.Я. Зарубин, С.М. Крутов. – СПб.: СПбГЛТА, 2010. – 272 с.
2. Азаров В. И. Химия древесины и синтетических полимеров: учебник для вузов / В. И. Азаров, А. В. Буров, А. В. Оболенская. – СПб.: СПбЛТА, 1999. – 628 с
3. Рязанова Т. В. Химия древесины: учебное пособие / Т. В. Рязанова, Н. А. Чупрова, Е. В. Исаева. – Красноярск: Изд-во КГТА, 1996. – 355 с.
4. Фенгел Д. Древесина (химия, ультраструктура, реакции) / Д. Фенгел, Г. Вегенер; пер. с англ.; под ред. А. А. Леоновича. – М.: Лесная промышленность, 1988. – 512 с.
5. Гемилцеллолозы: сб. обзоров / М.С. Дудкин [и др.]; под ред. В. С. Громова, М.С. Дудкина – Рига: Зинатне, 1991. – 488 с.
6. Боголицын К.Г. Химия сульфитных методов делигнификации древесины / К.Г. Боголицын, В.М. Резников. – М.: Экология, 1994.
7. Реутов О.А. Органическая химия; в 4-х частях / О.А. Реутов. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2004.
8. Никитин В.М. Теоретические основы делигнификации / В.М. Никитин. – М.: Лесная промышленность, 1981.
9. Петропавловский Г.А. Гидрофильные частично замещенные эфиры и их модификация путем химического сшивания / Г.А. Петропавловский. – Л.: Наука, 1988.
10. Грушников О.П. Достижения и проблемы химии лигнина / О.П. Грушников, В.В. Елкин. – М.: Наука, 1973.
11. Роговин З.А. Химические превращения и модификация целлюлозы / З.А. Роговин, Л.С. Гальбрайтх. – М.: Химия, 1979.
12. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. I. Древесина и разрушающие ее грибы. / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, В.И. Кондращенко; [Отв. ред. А.М. Безбородов]. – М.: Наука, 2001. – 264 с.

13. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка / Бисько Н.А., Дудка И.А. – Киев: Наук.думка, 1987. – 148 с.

14. Оболенская А. В., Ельницкая З. П., Леонович А. А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: Учебное пособие для вузов.—М.: «Экология», 1991.—320 с.

15. Журнал «Школа грибоводства»

16. Журнал «Микология и фитопатология»

17. Журнал «Органическая химия»

18. Журнал Российского химического общества

19. Журнал «Химия природных соединений»

20. Реферативный журнал «Химия»

21. Журнал «Химия растительного сырья»

22. Журнал «Химия в интересах устойчивого развития»

23. <http://www.springerlink.com/>:

24. <http://www.onlinelibrary.wiley.com/>:

25. <http://www.scopus.com/>

26. <http://www.elsevier.com/>

27. <https://scholar.google.ru/schhp?hl=ru>

28. <http://sci-hub.io/>

Пример оформления отчета по лабораторной работе в рабочем журнале

Дата начала работы:

(подпись преподавателя о допуске к
работе)

РАБОТА № 1

Название работы

Цель работы:

Необходимые реактивы:

Посуда и приборы:

Исследуемое растительное сырьё (основные характеристики):

План работы

Приводится в виде краткого конспекта отдельных этапов проведения эксперимента

Реакции

Полученные результаты и расчеты

Выводы:

Дата окончания работы:

Отчет принят: _____
(подпись преподавателя)