

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXIII, 27

SECTIO AA

1968

Z Katedry Chemii Ogólnej Wydziału Rolniczego WSR w Lublinie

Kierownik: prof. dr Jan Krupowicz

i z Zakładu Biochemii Wydziału Rolniczego WSR w Lublinie

Kierownik: doc. dr Kazimierz Blaim

Kazimierz BLAIM i Maria PRZESZLAKOWSKA

Wyodrębnianie i oznaczanie substancji pektynowych w materiale roślinnym

Изолирование и определение пектиновых веществ в растительном материале

Isolation and Determination of Pectic Substances in Plant Material

Pojęcie substancji pektynowych obejmuje zarówno rozpuszczalne, jak i nierozpuszczalne w wodzie połączenia poligalaktouronowe. Tę drugą grupę określa się mianem protopektyn. Protopektyny wyodrębnia się najczęściej z materiału roślinnego bardzo rozcieńczonymi, przeważnie ok. 0,01 n kwasami lub też 1% roztworem cytrynianu amonowego [11]. Przy zastosowaniu tego ostatniego roztworu następuje pełniejsze wyodrębnienie protopektyn w porównaniu z zastosowaniem do wyodrębniania rozcieńczonych kwasów. Użycie kwasów bardziej stężonych nie jest zalecane z uwagi na niebezpieczeństwo hydrolitycznego rozpadu połączeń pektynowych.

Klasyczną metodą oznaczania substancji pektynowych w materiale roślinnym jest metoda wagowa, polegająca na odpowiednim wyodrębnianiu tych połączeń i następnie na ich wytrąceniu przy pomocy jonów wapniowych. Metoda ta jest prosta i względnie dokładna, ale jest bardzo pracochłonna i wymaga dużych odważek analitycznych [2, 3, 10]. Inne metody, jak np. metody miareczkowe, czy też metody fizykochemiczne (polarograficzna, nefelometryczna) należą do metod żmudnych i są mało dokładne [1, 5, 9].

Ostatnio coraz częściej do oznaczania substancji pektynowych wprowadza się metody kolorymetryczne, oparte na barwnej reakcji, jaką w odpowiednich warunkach dają z karbazolem kwasy uronowe [4, 7, 11].

Kolorymetryczne oznaczanie połączeń pektynowych jest bardzo dogodnie i proste, szybkie i nie wymaga dużych odważek. Nasze badania wykazały, że w metodzie tej nie można stosować cytrynianu amonowego do wyodrębniania protopektyn, ponieważ przeszkadza on w barwnej reakcji karbazolu z kwasem galaktouronowym. W związku z tym podjęliśmy badania nad przydatnością do wyodrębniania połączeń pektynowych wodnego roztworu wersenianu dwusodowego (komplekson III). Odczynnik ten był po raz pierwszy użyty jako rozpuszczalnik do uwalniania pojedynczych komórek z tkanek roślinnych [6], jak również w połączeniu z pektynazą do wyodrębniania i oznaczania zawartości związków pektynowych w owocach [8].

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

ODCZYNNIKI, ROZTWORY I APARATURA

0,15% etanolowy roztwór karbazolu,
0,02% m zasadowy roztwór wersenianu dwusodowego ($pH=11$),
82% wodny roztwór etanolu,
 H_2SO_4 stężony czda,
kwas octowy lodowaty czda,
fotokolorymetr $pH=8$ firmy Coleman, filtr 8—209 (525) m μ próbki o średnicy 12 mm.

OPIS METODY

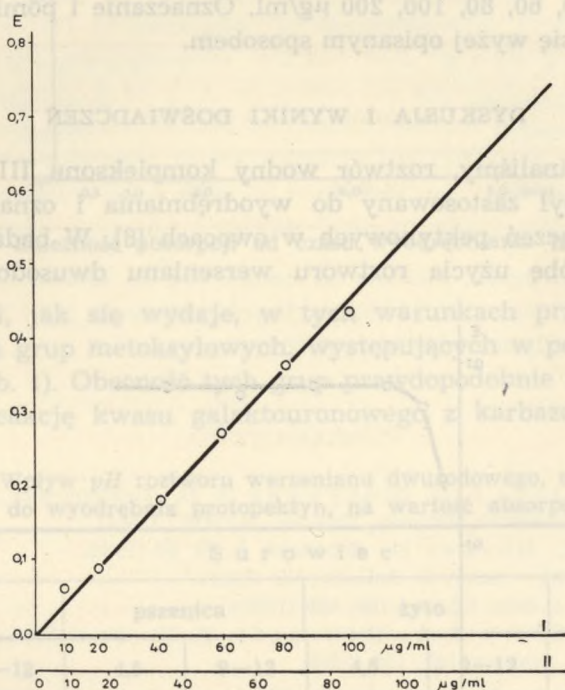
Przygotowanie materiału do analizy. Oznaczanie połączeń pektynowych można przeprowadzić w świeżym lub w wysuszonym materiale. Materiał roślinny przeznaczony do analizy poddaje się uprzednio ekstrakcji etanolowej w celu usunięcia cukrów, które przeszkadzają w barwnej reakcji połączeń pektynowych z karbazolem. Ekstrakcję prowadzi się na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w taki sposób, aby roztwór ekstrakcyjny był 82% w odniesieniu do etanolu. Próbkę z niewielką ilością cukrów (liście, zielone owoce) wystarczy poddawać ekstrakcji jednokrotnej 82% etanolem w ciągu 30 min. Próbkę z większą ilością cukrów poddaje się 2- 3-krotnej ekstrakcji, każda po 30 min. Pozostałość odsącza się na uprzednio wyważony sącdek i podusza początkowo przy 60°C, a następnie przy 100°C do stałej masy. W przypadku analizy materiału świeżego bierze się przeważnie próbkę 1 g i ekstrahuje 2—30 ml etanolu.

Wyodrębnianie pektyn rozpuszczalnych. Z odczkrzonego i wysuszonego materiału odważa się określoną ilość (w zależności od spodziewanej zawartości połączeń pektynowych) przeważnie po

0,5 g lub pozostałość z 1 g próbki wyjściowej materiału świeżego. Próbkę przenosi się do kolbki i zalewa 30 ml wody destylowanej. Zawartość kolbki ogrzewa się do wrzenia i następnie sączy do 50 ml kolbki miarowej. Sączek przemywa się 2, 3-krotnie ciepłą wodą i po ochłodzeniu zawartość kolbki uzupełnia wodą do kreski.

Wyodrębnienie protopektyn. Pozostałość na sączku przenosi się do kolby ekstrakcyjnej i zalewa 50 ml 0,02 molowym zasadowym roztworem kompleksonu III. Kolbę ogrzewa się na wrzącej łaźni wodnej w ciągu 2 godz. pod chłodnicą zwrotną. Wyciąg sączy się do 100 ml kolby miarowej, przemywa ciepłą wodą, zakwasza kwasem octowym do $pH = 5,0 - 5,5$ i uzupełnia wodą do kreski.

Oznaczenie. Oznaczanie substancji pektynowych w odpowiednich wyciągach oparte jest o reakcję, jaką dają kwasy heksouronowe



Ryc. 1. Krzywa kalibracyjna dla pektyny jabłkowej; I — stężenie pektyny w $\mu\text{g/ml}$, II — stężenie pektyny w przeliczeniu na pektynian wapniowy w $\mu\text{g/ml}$

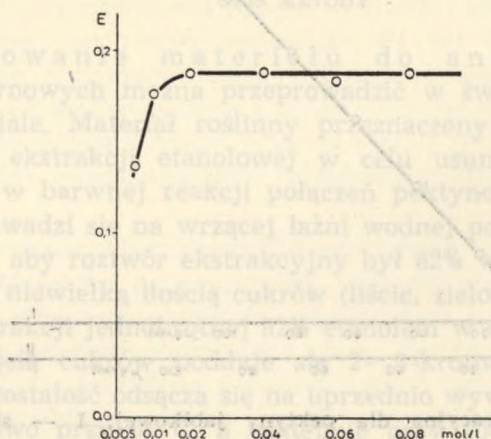
z karbazolem. W reakcji tej powstaje 5-karboksy-2-furfural, który w stężonym kwasie siarkowym daje barwne połączenie z maksimum pochłaniania, wynoszącym $535 \text{ m}\mu$ [12]. Do 1 ml otrzymanego wyciągu, zawierającego od 5 do 200 μg połączeń pektynowych, dodaje się przy jedno-

czesnym chłodzeniu 6 ml stężonego kwasu siarkowego. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się 20 min. na wrzącej łaźni wodnej, chłodzi i dodaje 0,2 ml 0,15% alkoholowego roztworu karbazolu, starannie miesza i pozostawia na 2 godz. w temperaturze pokojowej. Pojawiająca się purpurowa barwa jest trwała w przybliżeniu ok. 1 godz., a następnie zaczyna stopniowo słabnąć. Pomiarów ekstynkcji dokonuje się na odpowiednim fotokolorymetrze, a zawartość substancji pektynowych określa się z krzywej wzorcowej.

Wyznaczanie krzywej wzorcowej. Dla wyznaczenia krzywej wzorcowej odważono na wadze analitycznej 0,04 g preparatu pektyny jabłkowej o zawartości 85,1% czystego kwasu poligalaktouronowego w przeliczeniu na pektynian wapniowy. Odważkę rozpuszcza się w wodzie destylowanej w kolbie 200 ml. Z wyjściowego roztworu, zawierającego 200 μg w 1 ml, przygotowuje się szereg roztworów zawierających 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Oznaczanie i pomiary ekstynkcji przeprowadza się wyżej opisanym sposobem.

DYSKUSJA I WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Jak wspominaliśmy, roztwór wodny kompleksonu III w połączeniu z pektynazą był zastosowany do wyodrębniania i oznaczania ogólnej zawartości połączeń pektynowych w owocach [8]. W badaniach naszych podjęliśmy próbę użycia roztworu wersenianu dwusodowego bez do-

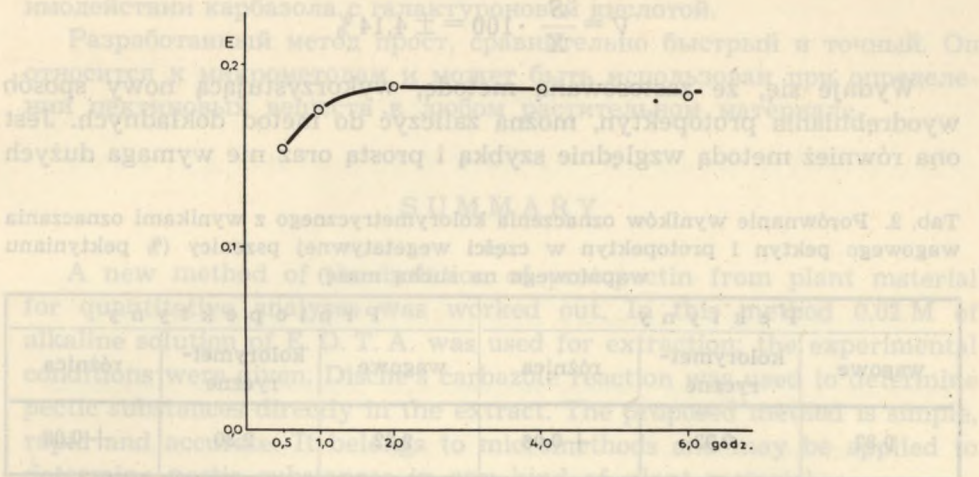


Ryc. 2. Wpływ stężenia wersenianu dwusodowego w roztworze ekstrahującym na wartość E

datku pektynazy do wyodrębniania protopektyn. W związku z tym przeprowadzono systematyczne badania nad określeniem optymalnych warunków wyodrębniania, uwzględniając przede wszystkim takie para-

metry, jak wpływ stężenia wersenianu dwusodowego, wpływ czasu na wyodrębnianie oraz wpływ pH .

Na podstawie wyników badań można sądzić, że najodpowiedniejszym stężeniem wersenianu dwusodowego jest 0,02 molowy roztwór (ryc. 2), zaś wystarczającym czasem wyodrębniania (na wrzącej łaźni wodnej) jest okres 2 godz. (ryc. 3), a środowisko zasadowe sprzyja wyodrębnianiu



Ryc. 3. Zależność absorpcji od czasu wyodrębniania protopektyn

protopektyn i, jak się wydaje, w tych warunkach przebiega również deestryfikacja grup metoksylowych, występujących w połączeniach pektynowych (tab. 1). Obecność tych grup prawdopodobnie ma duży wpływ na barwną reakcję kwasu galaktouronowego z karbazolem [7].

Tab. 1. Wpływ pH roztworu wersenianu dwusodowego, stosowanego do wyodrębniania protopektyn, na wartość absorpcji

S u r o w i e c							
pomidory		pszenica		żyto		jabłka	
4,5	9—12	4,5	9—12	4,5	9—12	4,5	9—12
0,26	0,26	0,085	0,195	0,09	0,28	0,22	0,32

O wiarygodności metody decyduje zarówno dokładność oznaczeń, jak i powtarzalność pomiarów. Dokładność oznaczeń sprawdzono metodą porównawczą (tab. 2). Celem wyznaczenia powtarzalności pomiarów wykonano 9 oznaczeń protopektyn, stosując do wyodrębniania 0,02 molowy

roztwór wersenianu dwusodowego. Z tych oznaczeń standartowe odchylenie średniego wyniku S obliczone ze wzoru:

$$\bar{S} = 0,6745 \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{X})^2}{n - 1}} \text{ wynosi } \pm 0,0078,$$

a błąd względny precyzji

$$V = \frac{\bar{S}}{\bar{X}} \cdot 100 = \pm 4,14 \%$$

Wydaje się, że zastosowaną metodę, wykorzystującą nowy sposób wyodrębniania protopektyn, można zaliczyć do metod dokładnych. Jest ona również metodą względnie szybką i prostą oraz nie wymaga dużych

Tab. 2. Porównanie wyników oznaczenia kolorymetrycznego z wynikami oznaczania wagowego pektyn i protopektyn w części vegetatywnej pszenicy (% pektynianu wapniowego na suchą masę)

P e k t y n y			P r o t o p e k t y n y		
wagowe	kolorymet- ryczne	różnica	wagowe	kolorymet- ryczne	różnica
0,87	0,93	+ 0,06	2,22	2,30	+ 0,08

odważek analitycznych. Metoda ta nadaje się do ilościowego oznaczania zarówno ogólnej zawartości substancji pektynowych, jak i poszczególnych ich frakcji w każdym materiale roślinnym.

PIŚMIENICTWO

1. Аймухомедова Г. Б., Шелухина Н. П.: Пектиновые вещества и методы их определения. Фрунзе, Изд-во „ИЛИМ” (1964).
2. Carre M. H., Hoynes D.: *Biochem. J.*, **16**, 60 (1922).
3. Conrad C. M.: *Amer. J. Bot.*, **13**, 531 (1926).
4. Dische Z.: *J. Biol. Chem.*, **183**, 489 (1950).
5. Gee M., McComb E. A., McCready R. M.: *Food Res.*, **23**, 1 (1958).
6. Letham D. S.: *Nature*, **181**, 135 (1958).
7. McComb E. A., McCready R. M.: *Anal. Chem.*, **24**, 1630 (1952).
8. McCready R. M., McComb E. A.: *Anal. Chem.*, **24**, 1986 (1952).
9. Райк С. Я.: Известия Молдавск. Филиала АН СССР, **2**, 68 (1960).
10. Сапожникова Е. В.: Биохимия плодов и овощей, сб. 4, Изд-во АН СССР (1958).
11. Сапожникова Е. В., Семочкина Л. Г., Барнашова Г. С.: Прикладная биохим. микробиол., **3**, 113 (1967).
12. Stutz E., Deuel H.: *Helv. Chim. Acta*, **39**, 2126 (1956).

РЕЗЮМЕ

Разработан новый метод изолирования протопектина из растительного материала. В исследованиях применялся 0,02-молярный раствор версена. Описаны условия изолирования протопектина. Пектиновые вещества в полученном экстракте непосредственно определялись при помощи колориметрического метода, основанного на взаимодействии карбазола с галактуроновой кислотой.

Разработанный метод прост, сравнительно быстрый и точный. Он относится к микрометодам и может быть использован при определении пектиновых веществ в любом растительном материале.

SUMMARY

A new method of the isolation of protopectin from plant material for quantitative analyses was worked out. In this method 0.02 M of alkaline solution of E. D. T. A. was used for extraction; the experimental conditions were given. Dische's carbazole reaction was used to determine pectic substances directly in the extract. The proposed method is simple, rapid and accurate. It belongs to micromethods and may be applied to determine pectic substances in any kind of plant material.

Badania oporu elektrycznego (R) błon komórek *Characeae* prowadzone są dalej w wielu laboratoriach. Określa się zmiany tego oporu wywołane zmianami różnych parametrów, takich jak koncentracja jonów w roztworze otaczającym komórkę [4, 7], natężenie pola elektrycznego [5] itp.

Na uwagę zasługuje jednak fakt, że chociaż wiele osób zajmowało się i aktualnie zajmuje badaniami tego oporu, jego wartość dla niektórych gatunków *Characeae* w ogóle nie była mierzona i — co ciekawsze — dla żadnego gatunku *Characeae* nie została dotychczas jednomyślnie określona; w zależności od stosowanej metody pomiarowej otrzymywano różne wartości R , zawarte w granicach od kilku $k\Omega \text{ cm}^2$ do kilkuset $k\Omega \text{ cm}^2$ [3, 11].

Celem niniejszej pracy było wyznaczenie wartości oporu błon komórki *Nitella mucronata*, ściślej — wartości oporu warstwy rozdzielającej wodniczkę tej komórki od zewnętrznego otoczenia.

W znanym piśmiennictwie jedynie Umrazh [10] dokonał pomiaru

Результаты работы по изучению пектиновых ферментов в растениях семейства Розовые (Rosaceae) и их роли в процессе созревания плодов и плодовитости растений.

Разработан новый метод количественного определения пектина в растительном материале. Нормализованный экстракт пектина, полученный из растительного материала, используется для определения пектина. Этот метод позволяет определять пектин в растительном материале с высокой точностью и надежностью. Метод основан на использовании пектиназы, которая гидролизует пектин до глюкозы и галактозы.

Разработанный метод прост, экономичен и точен. Он относится к микрометодам и может быть использован при определении пектина в растительном материале. Метод позволяет определять пектин в растительном материале с высокой точностью и надежностью.

SUMMARY

A new method of the isolation of pectogectin from plant material for quantitative analyses was worked out in this paper. 0.02 M of alkaline solution of E. D. T. A. was used for extraction; the experimental conditions were given. Dische's tartrate reaction was used to determine pectic substances directly in the extract. The proposed method is simple, rapid and accurate. It belongs to micro-methods and may be applied to determine pectic substances in any kind of plant material.

Разработан новый метод количественного определения пектина в растительном материале. Нормализованный экстракт пектина, полученный из растительного материала, используется для определения пектина. Этот метод позволяет определять пектин в растительном материале с высокой точностью и надежностью. Метод основан на использовании пектиназы, которая гидролизует пектин до глюкозы и галактозы.

Метод прост, экономичен и точен. Он относится к микрометодам и может быть использован при определении пектина в растительном материале. Метод позволяет определять пектин в растительном материале с высокой точностью и надежностью.

PIŚMIENNICTWO

1. А. А. Шелухина, Г. В. Шелухина, И. П. Шелухина: *Известия высших учебных заведений. Биологический журнал*, 1964, № 1, с. 1-4.
2. Carr M. R., Hoyle D.: *Biochem. J.*, 19, 60 (1925).
3. Conrad C. M.: *Amer. J. Bot.*, 13, 531 (1926).
4. Dische Z.: *J. Biol. Chem.*, 193, 489 (1950).
5. Gee M., McComb E. A., McCready R. M.: *Food Res.*, 23, 1 (1958).
6. Latham D. S.: *Nature*, 181, 135 (1958).
7. McComb E. A., McCready R. M.: *Anal. Chem.*, 24, 1630 (1952).
8. McCready R. M., McComb E. A.: *Anal. Chem.*, 24, 1606 (1952).
9. Раж С. В.: *Известия Академии Наук СССР*, 2, 55 (1959).
10. Садовникова Е. В.: *Высшие растения и плоды*, т. 4, Изд-во АН СССР (1959).