

ПИЩЕВАЯ ХИМИЯ

Лабораторный практикум

Рекомендовано Учебно-методическим объединением по образованию в области технологии продуктов питания и пищевой инженерии в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению подготовки 552400 «Технология продуктов питания» по специальностям 270100 «Технология хранения и переработки зерна», 270300 «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий», 270400 «Технология сахаристых продуктов», 270500 «Технология бродильных производств и виноделие», 270700 «Технология жиров, эфирных масел и парфюмерно-косметических продуктов» направления подготовки дипломированного специалиста 655600 «Производство продуктов питания из растительного сырья» и по специальности 271300 «Пищевая инженерия малых предприятий» направления подготовки дипломированного специалиста 655800 «Пищевая инженерия».

Санкт-Петербург
ГИОРД
2006

УДК 664:54(076.5)

ББК 36.1

П368

Рецензенты:

д. т. н., проф. *Тырсин Ю. А.* — проректор по научной работе Московского государственного университета технологии и управления;

д. б. н. *Топунов А. Ф.* — ведущий научный сотрудник института биохимии им. А. Н. Баха РАН;

к. х. н. *Басонов В. В.* — руководитель лаборатории химии пищевых продуктов ГУ НИИ питания РАМН

П368 Пищевая химия: Лабораторный практикум. Пособие для вузов / А. П. Нечаев, С. Е. Траубенберг, А. А. Кочеткова и др.; Под ред. А. П. Нечаева. — СПб: ГИОРД, 2006. — 304 с.: ил. ISBN 5-98879-037-2

В учебном пособии описаны методы работы, позволяющие изучить свойства различных веществ, входящих в состав пищевых продуктов, определить их содержание, а также исследовать некоторые процессы, приводящие к изменениям состава и свойств основных веществ пищи.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлениям: 552400 «Технология продуктов питания», 655600 «Производство продуктов питания из растительного сырья», 655700 «Технология продуктов специального назначения и общественного питания», 655800 «Пищевая инженерия» (специальность 271300).

УДК 664 : 54(076.5)

ББК 36.1

ISBN 5-98879-037-2

© Авторы, 2006
© ЗАО ГИОРД, 2006

Оглавление

<i>Введение</i>	11
<i>Правила техники безопасности и организации работы в химической лаборатории</i>	12
ТЕМА 1. БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА	15
1.1. Выделение и очистка белков	17
1.2. Методы определения содержания белка и аминокислот	19
1.2.1. Определение общего азота по методу Кьельдаля	19
1.2.2. Определение белкового и небелкового азота по методу Кьельдаля	22
1.2.3. Определение белка по методу Лоури	23
1.2.4. Определение белка с кумасси синим по Бредфорду	24
1.2.5. Определение аминного азота методом формольного титрования	25
1.2.6. Определение аминного азота («медный способ»)	26
1.3. Методы фракционирования белков	27
1.3.1. Метод гель-хроматографии	27
1.3.2. Метод ионообменной хроматографии	30
1.3.3. Метод аффинной хроматографии	31
1.3.4. Электрофоретическое разделение белков	32
1.3.5. Изоэлектрическое фокусирование белков	32
1.3.6. Определение аминокислотного состава белков с помощью аминокислотного анализатора	33
1.4. Лабораторные работы	34
<i>Лабораторная работа 1.4.1. Построение калибровочной кривой для определения белка по методу Лоури</i>	34
<i>Лабораторная работа 1.4.2. Экстракция и осаждение белков</i>	36
<i>Лабораторная работа 1.4.3. Калибровка колонки с ссфадексом G-50</i>	39

<i>Лабораторная работа 1.4.4. Фракционирование веществ методом гель-хроматографии через сефалекс</i>	41
<i>Лабораторная работа 1.4.5. Автолиз белков зерна и суточного солода</i>	44
Контрольные вопросы	45
ТЕМА 2. УГЛЕВОДЫ	46
2.1. Методы определения углеводов	47
2.1.1. Определение восстанавливающих сахаров по методу Бертрана	47
2.1.2. Определение восстанавливающих сахаров колориметрическим методом (по И. С. Лурье)	49
2.1.3. Определение восстанавливающих сахаров методом Шомальи -- Нельсона	51
2.1.4. Определение фруктозы и других кетосахаров (по Мак-Рери и Слаттери)	52
2.1.5. Газохроматографическое определение отдельных сахаров	52
2.1.6. Определение декстринов по методу М. П. Попова и Е. Ф. Шаненко	57
2.1.7. Поляриметрическое определение содержания крахмала (по Эверсу)	58
2.1.8. Определение крахмала йодометрическим методом (по Х. Н. Починку)	61
2.1.9. Антроновый метод определения сахаров и крахмала	63
2.1.10. Определение клетчатки (по Кюшнеру и Ганаку)	64
2.1.11. Определение пищевых волокон ферментативным методом	65
2.2. Лабораторные работы	70
<i>Лабораторная работа 2.2.1. Качественный анализ низкомолекулярных углеводов в пищевых продуктах: идентификация по функциональным группам по методу тонкослойной хроматографии</i>	70
<i>Лабораторная работа 2.2.2. Определение содержания общего сахара в продуктах кондитерского производства</i>	78
<i>Лабораторная работа 2.2.3. Изменение содержания сахаров в процессе приготовления хлеба</i>	81
<i>Лабораторная работа 2.2.4. Кислотный гидролиз крахмала и идентификация продуктов гидролиза</i>	86
Контрольные вопросы	88

ТЕМА 3. ЛИПИДЫ	89
3.1. Методы выделения и определения липидов	91
3.1.1. Определение общего содержания липидов методом экстракции смесью Фолча	91
3.1.2. Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов методом экстракции по Блайя — Дайеру	92
3.1.3. Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов с использованием фильтрующей делительной воронки	93
3.1.4. Определение массовой доли «свободных» липидов методом экстракции на аппарате Сокслета	94
3.2. Анализ группового и жирнокислотного состава липидов	95
3.3. Анализ физико-химических показателей жиров и масел	97
3.3.1. Определение температуры плавления	97
3.3.2. Определение кислотного числа	98
3.3.3. Определение перекисного числа	99
3.4. Лабораторные работы	100
<i>Лабораторная работа 3.4.1.</i> Определение массовой доли «свободных» липидов в различных пищевых объектах	100
<i>Лабораторная работа 3.4.2.</i> Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов в растительном сырье и продуктах его переработки	102
<i>Лабораторная работа 3.4.3.</i> Экстракция липидов из пищевого объекта и определение их группового состава	103
<i>Лабораторная работа 3.4.4.</i> Анализ группового и жирнокислотного состава пищевых жиров и масел	106
<i>Лабораторная работа 3.4.5.</i> Определение физико- химических показателей качества жиров и масел	109
Контрольные вопросы	110
ТЕМА 4. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА	111
4.1. Методы определения минеральных веществ	113
4.1.1. Определение зольности	113
4.1.2. Определение натрия и калия методом ионометрии	114
4.1.3. Определение натрия и калия методом пламенной фотометрии	115
4.1.4. Определение содержания железа методом фотометрии	117
4.1.5. Метод атомно-абсорбционной спектроскопии	118

4.2. Лабораторные работы	118
<i>Лабораторная работа 4.2.1. Изучение минерального состава пищевых продуктов</i>	118
<i>Лабораторная работа 4.2.2. Определение содержания ионов кальция в соках, виноматериалах и винах</i>	121
<i>Лабораторная работа 4.2.3. Применение ионометрии для анализа неорганических катионов и анионов в пищевом сырье и пищевых продуктах</i>	122
<i>Лабораторная работа 4.2.4. Определение некоторых ионов (Fe, Cu, Ni и Mn) в пищевых продуктах методом атомно-абсорбционной спектроскопии</i>	129
Контрольные вопросы	132
ТЕМА 5. ВИТАМИНЫ	133
5.1. Общие сведения	133
<i>Лабораторная работа 5.1.1. Одновременное определение витаминов А, Е и каротиноидов в БАД методом высокоэффективной жидкостной хроматографии</i>	134
5.2. Количественное определение, витаминов А, Е и β-каротина	135
<i>Лабораторная работа 5.2.2. Метод определения аскорбиновой кислоты (витамин С)</i>	141
Контрольные вопросы	147
ТЕМА 6. ПИЩЕВЫЕ КИСЛОТЫ	148
6.1. Газохроматографическое определение отдельных органических кислот	149
6.2. Лабораторные работы	153
<i>Лабораторная работа 6.2.1. Исследование кислотного состава сухофруктов</i>	153
<i>Лабораторная работа 6.2.2. Газохроматографическое определение яблочной, винной и лимонной кислот в меде и джеме</i>	154
<i>Лабораторная работа 6.2.3. Газохроматографическое определение молочной кислоты в молочных продуктах</i>	156
Контрольные вопросы	159
ТЕМА 7. ФЕРМЕНТЫ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ	160
7.1. Способы выражения активности ферментов	162

7.2. Методы определения активности ферментов	162
7.2.1. Определение активности алкогольдегидрогеназы	163
7.2.2. Определение активности липоксигеназы по модифицированному методу Л. Е. Дубцова и М. И. Попова	164
7.2.3. Определение активности пероксилазы (по Боярышну)	165
7.2.4. Определение активности каталазы (по Баду и Оварину)	166
7.2.5. Определение активности амилаз колориметрическим методом	167
7.2.6. Определение активности протеаз модифицированным методом Ансона	168
7.2.7. Определение активности эндоглюконаз фотоколориметрическим методом с применением реактива Шоматьи - Нельсона	169
7.2.8. Определение активности эндоглюконаз фотоколориметрическим методом с применением автронового реактива	170
7.2.9. Определение активности пектингестеразы	171
7.2.10. Титриметрический метод определения ливазы зерновых культур	172
7.3. Лабораторные работы	173
<i>Лабораторная работа 7.3.1. Амилазы и их ингибиторы</i>	173
<i>Лабораторная работа 7.3.2. Протеазы и их белковые ингибиторы</i>	179
<i>Лабораторная работа 7.3.3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность солодовой α-амилазы</i>	183
<i>Лабораторная работа 7.3.4. Фракционирование картофельного сока методом гель-хроматографии. Изучение ингибирующей активности различных фракций</i>	185
<i>Лабораторная работа 7.3.5. Определение интенсивности выделения дрожжами глутатиона в процессе брожения</i>	189
<i>Лабораторная работа 7.3.6. Исследование продуктов, выделяемых дрожжами при спиртовом брожении</i>	192
Контрольные вопросы	194
ТЕМА 8. ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ	196
8.1. Пищевые эмульгаторы	196
8.2. Изучение состава пищевых эмульгаторов глицеридной природы	198

8.3. Лабораторные работы	201
<i>Лабораторная работа 8.3.1. Определение группового и жирнокислотного состава эмульгаторов глицеридной природы</i>	201
<i>Лабораторная работа 8.3.2. Исследование состава коммерческих образцов лецитинов</i>	204
<i>Лабораторная работа 8.3.3. Изучение свойств пищевых эмульгаторов</i>	208
8.4. Загустители и гелеобразователи	210
8.5. Фотоколориметрическое определение меди	211
8.6. Лабораторные работы	212
<i>Лабораторная работа 8.6.4. Изучение комплексообразующей способности пектинов</i>	212
8.7. Консерванты	217
8.8. Хроматографическое определение бензойной и сорбиновой кислот	217
8.8.1. Выделение бензойной и сорбиновой кислот	218
8.9. Лабораторные работы	222
<i>Лабораторная работа 8.9.5. Идентификация и определение консервантов в маргариновой продукции методом тонкослойной хроматографии</i>	222
Контрольные вопросы	225
ТЕМА 9. ВОДА	227
9.1. Методы определения влаги	228
9.1.1. Определение общего содержания влаги методом высушивания до постоянной массы	228
9.1.2. Определение общего содержания влаги методом титрования по модифицированному методу Карла Фишера	228
9.1.3. Определение влажности пищевых продуктов с применением ИК-сушки	229
9.1.4. Определение свободной и связанной влаги методом дифференциальной сканирующей калориметрии	230
9.1.5. Определение свободной и связанной влаги термогравиметрическим методом	230
9.1.6. Определение свободной и связанной влаги на основе диэлектрических измерений	230
9.1.7. Определение свободной и связанной влаги на основе измерения теплоемкости	230

9.1.8. Определение свободной и связанной влаги методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР)	231
9.1.9. Определение активности воды на автоматическом приборе «Аквалаб»	231
9.2. Лабораторные работы	232
<i>Лабораторная работа 9.2.1. Определение влажности по методу Карла Фишера</i>	<i>232</i>
<i>Лабораторная работа 9.2.2. Определение массовой доли влаги методом высушивания до постоянной массы</i>	<i>235</i>
<i>Лабораторная работа 9.2.3. Применение ИК-сушки для определения влажности пищевых продуктов</i>	<i>237</i>
<i>Лабораторная работа 9.2.4. Определение активности воды в кондитерских изделиях</i>	<i>238</i>
Контрольные вопросы	241
ТЕМА 10. БЕЗОПАСНОСТЬ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	242
10.1. Методы анализа показателей безопасности пищевых продуктов	242
10.1.1. Методы определения микотоксинов	242
10.1.2. Методы определения нитратов, нитритов, N-нитрозоаминов	243
10.1.3. Методы определения насыщенных и ароматических углеводов	245
10.1.4. Методы определения тяжелых металлов	245
10.1.5. Количественный полярографический анализ	249
10.2. Лабораторные работы	250
<i>Лабораторная работа 10.2.1. Определение тяжелых металлов в пищевом сырье и пищевых продуктах методом переменного тока полярографии</i>	<i>250</i>
<i>Лабораторная работа 10.2.2. Анализ содержания нитратов в плодоовощной продукции с помощью нитратного ионоселективного электрода</i>	<i>254</i>
<i>Лабораторная работа 10.2.3. Изучение комплексообразующей способности пектинов</i>	<i>255</i>
Контрольные вопросы	259
ТЕМА 11. ОСНОВЫ ПИТАНИЯ И ПИЩЕВАРЕНИЯ	260
<i>Лабораторная работа 11.1. Методы расчета пищевой и энергетической ценности пищевых продуктов</i>	<i>260</i>
<i>Лабораторная работа 11.2. Методы оценки качества белка и биологической ценности пищевых продуктов</i>	<i>267</i>

<i>Лабораторная работа 11.3. Гидролитическое расщепление белка ферментами поджелудочной железы</i>	272
<i>Лабораторная работа 11.4. Свойства и качественные реакции на стерины и желчные кислоты</i>	276
<i>Лабораторная работа 11.5. Гидролитическое расщепление жира липазой</i>	282
Контрольные вопросы и задачи	283
Приложения	285
<i>Приложение 1. Приготовление буферных растворов</i>	285
<i>Приложение 2. Плотности и концентрации растворов некоторых кислот</i>	289
<i>Приложение 3. Индикаторы, наиболее часто применяемые на практике</i>	291
<i>Приложение 4. Универсальные индикаторы</i>	293
<i>Приложение 5. Приготовление некоторых реактивов</i>	294
<i>Приложение 6. Расчет количества сульфата аммония при фракционировании белков методом высаливания</i>	296
<i>Приложение 7. Характеристика различных марок сефадексов</i>	297
<i>Приложение 8. Соотношение между содержанием сахаров в растворе и количеством восстановленной меди</i>	298
<i>Приложение 9. Предельно-допустимые концентрации (ПДК)</i>	299
<i>Приложение 10. Содержание калия, натрия, кальция в некоторых пищевых продуктах</i>	300
Литература	301

Введение

Пищевая химия является одной из химических дисциплин, знания которых необходимы для понимания всех сложных процессов, протекающих в пищевой системе, начиная от исследования пищевого сырья до получения из него продуктов питания. Это сложный комплекс превращений, в основе которых лежат гидролитические, окислительные процессы, процессы взаимодействия отдельных компонентов между собой, протекающих с разной скоростью под влиянием различных факторов: температуры, рН-среды, давления и т. д. Понимание этих процессов требует в первую очередь знания структуры и свойств макронутриентов: белков, углеводов, липидов. Но не менее важны знания о микронутриентах, содержащихся в пищевых системах: минеральных веществах, витаминах, а также о компонентах, специально вносимых с технологической целью, пищевых добавках. Понимание роли каждого из этих компонентов, особенности их превращений, методов их анализа дает возможность инженеру-технологу грамотно управлять технологическим процессом и получать безопасные пищевые продукты, отвечающие требованиям науки о питании. Авторы настоящего пособия надеются, что освоение методов исследования, содержащихся в настоящем лабораторном практикуме, даст возможность будущим специалистам управлять сложными технологиями получения современных продуктов питания, контролировать технологический процесс, качество и безопасность получаемых продуктов питания.

Правила техники безопасности и организации работы в химической лаборатории

При работе в химической лаборатории всегда нужно помнить, что многие органические и неорганические соединения в той или иной мере ядовиты, а некоторые из них огнеопасны и взрывоопасны. Поэтому в процессе работы необходимо соблюдать чистоту, следить за тем, чтобы вещества не попадали на кожу, не трогать руками лицо и глаза, не принимать пищу в химической лаборатории, после работы и перед едой тщательно мыть руки. Категорически запрещается работать в химической лаборатории одному.

Существует ряд общих правил, выполнение которых строго обязательно:

1. Приступать к выполнению работы можно только с разрешения преподавателя, после прохождения соответствующего инструктажа по технике безопасности и правилам работы в лаборатории. Перед выполнением работы необходимо ознакомиться с имеющимися средствами противопожарной безопасности, аптечкой с набором необходимых средств оказания первой помощи при несчастных случаях.

2. Проводить лабораторную работу следует в рабочем халате из хлопчатобумажной ткани, быть аккуратным и внимательным. Запрещается держать на лабораторных столах портфели, сумки и другие посторонние предметы.

3. Перед выполнением каждой операции следует проверять правильность сборки прибора, а также соответствие взятых для проведения опыта веществ, указанных в описании работы. Прежде чем взять необходимое количество вещества, следует внимательно прочитать надпись на этикетке лабораторной посуды, в которой содержится это вещество.

4. На всех банках, склянках и на другой посуде, в которой хранятся вещества, должно быть четко указано их название.

5. Нельзя проводить опыты в загрязненной посуде. После окончания эксперимента лабораторную посуду необходимо вымыть.

6. Категорически запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения.

7. Запрещается пробовать химические вещества на вкус, всасывать ртом любые жидкости в пипетки. При исследовании запаха жидкости следует осторожно направлять к себе ее пара легким движением руки.

8. Нельзя наглухо закрывать приборы для проведения реакций, нагревания растворов и перегонки жидкостей, так как это может привести к взрыву.

9. Запрещается нагревать летучие и легковоспламеняющиеся жидкости и вещества (эфир, бензин, спирт, ацетон и др.) на открытом пламени горелки. Для этого необходимо использовать водяные или песчаные бани, а также электроплитки с закрытой спиралью. При перегонке таких веществ обязательно нужно применять холодильники с водяным охлаждением. Нельзя перегонять жидкости досуха — это может привести к взрыву или пожару.

10. Категорически запрещается держать ртуть в открытой посуде. В случае поломки прибора, содержащего ртуть, необходимо поставить об этом в известность преподавателя или лаборанта. Разлитую ртуть собирают с помощью амальгамированной медной пластинки в специальные толстостенные банки, закрытые пробкой. Остатки ртути следует обработать 20 %-ным водным раствором хлорида железа(III) или порошком серы.

11. Металлический натрий следует обязательно хранить под слоем керосина, толуола или ксилола, не содержащих следов воды. Приступая к работе, необходимо насухо вытереть стол и высушить посуду, в которой будет проводиться реакция с металлическим натрием. После окончания работы следует уничтожить остатки натрия, растворяя их в спирте. Нельзя остатки натрия бросать в раковины или оставлять открытыми на воздухе.

12. Концентрированные кислоты, щелочи, ядовитые и сильно пахнущие вещества обязательно хранить в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу.

13. Концентрированные соляную и азотную кислоты переливать только в вытяжном шкафу. При разбавлении кислоты необходимо осторожно, небольшими порциями, при постоянном перемешивании прибавлять кислоту к воде, а не наоборот! Глаза при этом должны быть защищены очками.

14. При попадании кислот на кожу нужно быстро промыть обожженное место струей воды, а затем — 2...3 %-ным раствором соды. При ожоге едкими щелочами надо также хорошо промыть обожженное

место водой, затем — 2...3 %-ным раствором уксусной кислоты. При случайном попадании кислоты или щелочи в глаза тотчас промыть их большим количеством воды, затем обработать тампоном, смоченным в растворе соды, вновь промыть водой и обратиться к врачу.

15. Особую осторожность нужно проявлять при работе с бромом, так как это очень ядовитое вещество, сильно действующее на слизистые оболочки и дающее трудно заживающие ожоги. Все работы с бромом следует проводить только в вытяжном шкафу, в очках и специальных резиновых перчатках. При попадании брома на кожу необходимо немедленно протереть обожженное место спиртом, а затем смазать глицерином.

16. При работах, производимых с использованием вакуума или повышенного давления, при переливании кислот или растворов щелочей, при реакциях, сопровождающихся бурным вскипанием, необходимо надевать предохранительные очки или использовать щиток из органического стекла. Такие операции лучше проводить в вытяжном шкафу, закрыв дверцы шкафа таким образом, чтобы лицо было защищено от брызг или осколков в случае взрыва. При работе с вакуум-эксикатором или колбой Бунзена необходимо поместить их в специальные защитные мешочки или обернуть плотной тканью во избежание попадания осколков стекла в случае взрыва.

17. К работе со сжатым или сжиженным газом (баллонами) допускаются лица, прошедшие специальный инструктаж по технике безопасности.

18. При обнаружении запаха газа в лаборатории необходимо выключить газовую магистраль и тщательно проветрить лабораторию. Категорически запрещается в это время пользоваться спичками, а также включать электрический свет.

19. Следует бережно и аккуратно обращаться с посудой, приборами и предметами оборудования, стараться разумно экономить реактивы, газ, воду и электричество.

20. Уходя из лаборатории, необходимо выключить газовые горелки и электрические приборы, закрыть воду и привести в порядок свое рабочее место.

БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА

Белковые вещества — неотъемлемая часть любого биологического объекта, в том числе и пищевого сырья как растительного, так и животного происхождения. Белки относятся к макронутриентам и являются для человека поставщиком аминокислот, в том числе и незаменимых, то есть выполняют пластическую функцию и могут служить источником энергии. Кроме этого, белкам в организме присущи многообразные специфические функции: каталитическая, транспортная, рецепторная, гормональная и многие другие. С точки зрения пищевой ценности белки делятся на полноценные и неполноценные.

К наиболее важным функциональным свойствам белков следует отнести растворимость, водо- и жиросвязывающую способность, способность стабилизировать дисперсные системы (эмульсии, пены, суспензии), способность образовывать гели. Реологические свойства (вязкость, упругость, эластичность) белков очень важны с технологической с точки зрения. В пищевых продуктах белки, наряду с другими компонентами, обуславливают текстуру, внешний вид и влияют на органолептические свойства продукта.

При производстве пищевых продуктов белки, входящие в состав пищевого сырья, претерпевают изменения, среди которых основным является денатурация.

Методы определения белка могут быть разделены на качественные и количественные.

Присутствие белков в пищевых объектах устанавливается с помощью *качественных* реакций, таких как цветные реакции на белки и реакции осаждения. К первой группе относятся биуретовая реакция на пептидные связи, ксантопротеиновая реакция на ароматические аминокислоты, реакция Паули, обусловленная присутствием в белках гистидина и тирозина, реакция Адамкевича и Вуазене — триптофана, реакция Фоля и нитропруссидная реакция — серосодержащих аминокислот, реакция Сакагучи — аргинина, реакция

Миллона — тирозина, нингидриновая реакция на аминную группу α -аминокислот. Реакцию Райдона и Смита используют для обнаружения циклопептидов. Вторая группа реакций связана со способностью белков осаждаться под действием солей, органических растворителей, температуры, концентрированных кислот и щелочей и других денатурирующих факторов. В изоэлектрической точке белки легко осаждаются, поскольку имеют наименьшую растворимость.

Среди количественных методов определения содержания белка, в первую очередь, следует отметить метод Кьельдаля — определения белка по содержанию азота, который является унифицированным ме-

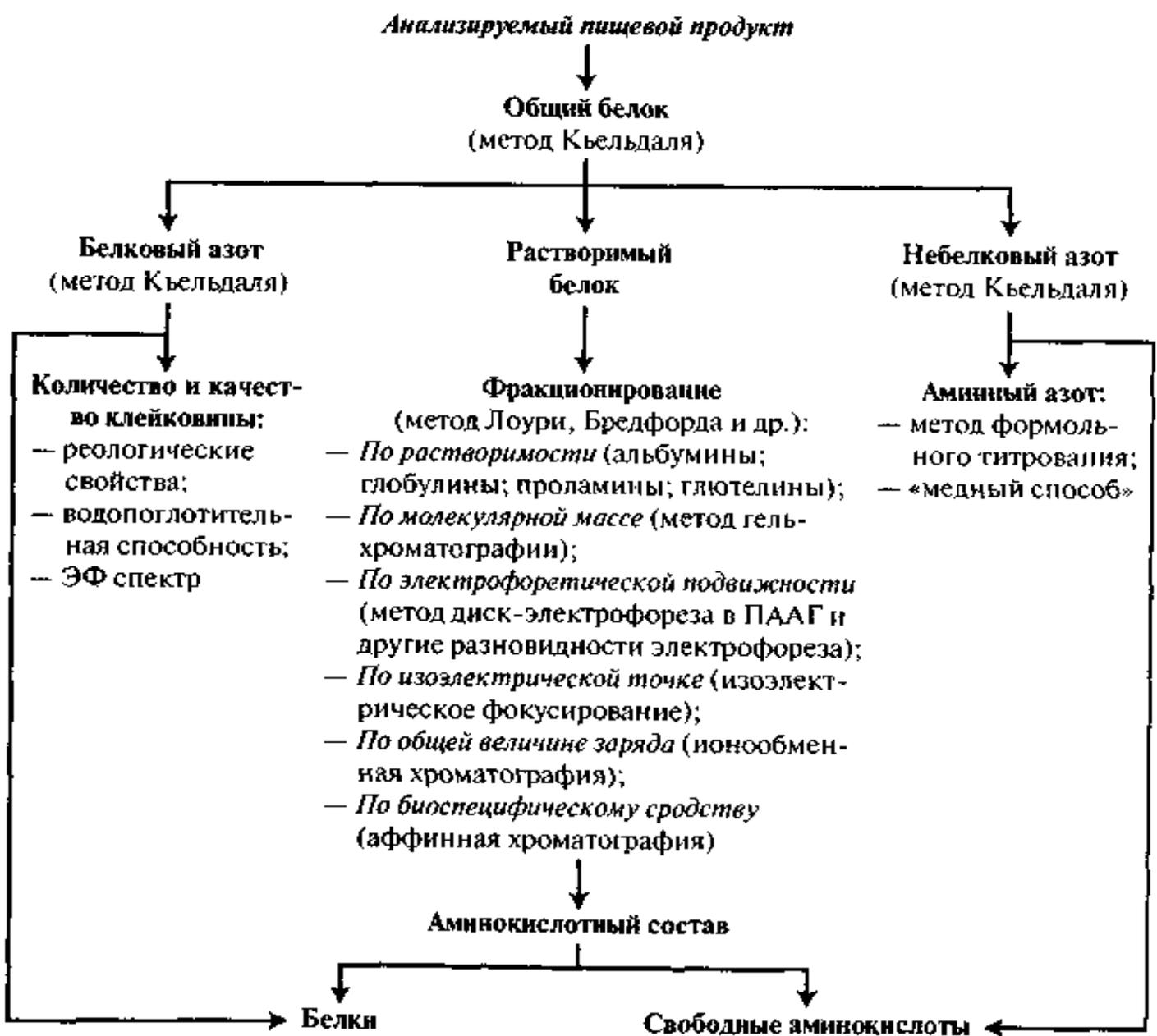


Рис. 1.1. Анализ белков

тодом и включен в ГОСТы на продовольственное сырье и многие пищевые продукты.

Метод Кьельдаля применяют в нескольких модификациях, отличающихся в основном условиями минерализации, при этом используют разные катализаторы для ускорения процесса, а также различные аппаратные решения. В настоящее время созданы и используются на практике высокопроизводительные автоматические анализаторы, которые значительно упрощают трудоемкий анализ.

Для количественного определения белка применяют также биуретовый метод, в основе которого лежит цветная биуретовая реакция; нефелометрический метод, основанный на измерении интенсивности опалесценции белков в присутствии некоторых химических реагентов; спектрофотометрический метод, основанный на способности ароматических аминокислот поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом при 280 нм. Широкое распространение получил метод Лоури, в основе которого лежит комбинация биуретового метода и метода Фолина, благодаря тому, что он чувствительнее биуретовой реакции, мало зависит от состава белка, а также прост и удобен для серийных анализов.

В общем виде анализ белков продовольственного сырья и пищевых продуктов можно представить следующим образом (см. рис. 1.1).

1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ

Изучение белков любого биологического материала начинается с их выделения и частичной очистки. Работа по выделению и очистке белков состоит из последовательных этапов, основными из которых являются следующие.

1. Разрушение клеточной структуры материала. В зависимости от природы исследуемого объекта применяются различные способы разрушения клеточной структуры материала, например, измельчение, растирание в ступке, гомогенизация с использованием гомогенизаторов различной конструкции, использование ультразвуковых дезинтеграторов и др.

2. Экстракция белков. Для экстракции белков используют различные экстрагенты (вода, солевые растворы, разбавленные растворы

щелочей и кислот и др.); подбор режима экстракции позволяет избирательно перевести в раствор разные группы белков.

3. Осаждение белков. Эта операция имеет многоцелевое назначение.

В зависимости от цели, с которой проводится выделение белков, можно применять «жесткие» или «мягкие» режимы осаждения белков.

К «жестким» режимам будут относиться режимы осаждения, основанные на денатурации белка. Их применяют в том случае, если в дальнейшем не предполагается исследовать биологическую активность выделенных белков:

а) осаждение белков трихлоруксусной кислотой (ТХУ) позволяет отделить белки от пептидов и аминокислот (белковый азот отделяется от небелкового азота). При этом происходит необратимая денатурация белков;

б) тепловая коагуляция белков применяется для осаждения термолабильных белков, при этом не ставится задача сохранения нативной структуры белка.

К «мягким» режимам осаждения относятся: высаливание (осаждение насыщенными растворами солей) и осаждение в изоэлектрической точке. Эти способы осаждения позволяют выделять белки в нативном состоянии и применяются в том случае, когда необходимо исследовать биологическую активность белков.

Для высаливания белков используют сульфат аммония. Разные группы белков осаждаются при разных концентрациях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. При ступенчатом осаждении можно выделить отдельные белковые фракции, например, фракцию белков, обладающих ферментативной активностью.

Избирательное осаждение белков можно провести при изменении рН белкового раствора (осаждение в изоэлектрической точке). При этом способе обычно сохраняется нативная структура белков, как в осадке, так и в надосадочной жидкости.

4. Очистка белков с использованием современных физико-химических методов. Применение таких методов позволяет получить индивидуальные белки в нативном состоянии. К таким методам следует отнести гель-хроматографию, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, различные разновидности электрофореза, изоэлектрическое фокусирование и другие.

Операции по выделению белков контролируются по выходу белка и по его активности.

1.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА И АМИНОКИСЛОТ

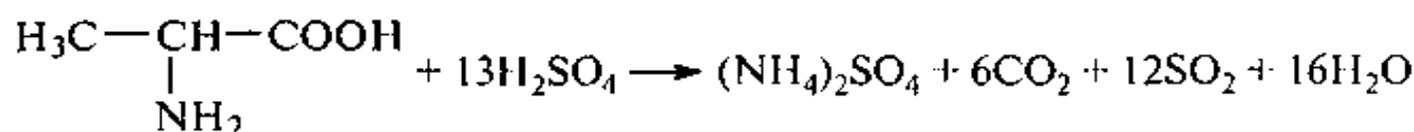
1.2.1. Определение общего азота по методу Кьельдаля

Обязательным составным элементом белковых веществ является азот.

Содержание азота в различных белках колеблется в довольно ограниченных пределах (15...18 %), что дает возможность судить по количеству азота о количестве белка в биологическом материале.

Определение азота по методу Кьельдаля сводится к двум основным операциям:

1. Сжигание навески испытуемого материала в концентрированной серной кислоте. При этом происходит минерализация всех органических соединений до CO_2 и H_2O ; азот превращается в аммиак и связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония. Реакция идет согласно уравнению, в котором в качестве примера используется протеиногенная аминокислота аланин:



Сжигание проводят в специальных тугоплавких длинногорлых колбах или пробирках в вытяжном шкафу. Для ускорения сжигания добавляют катализатор (тонко растертую смесь сульфата меди и сульфата калия или селен).

2. Определение азота, связанного в виде сульфата аммония. Содержимое колбы Кьельдаля после сжигания переносят в отгонный аппарат. Туда же добавляют концентрированный раствор щелочи для нейтрализации серной кислоты и создания щелочной среды. В щелочной среде при кипении сульфат аммония разлагается с выделением аммиака:



Образовавшийся аммиак перегоняется с водяным паром и улавливается титрованным раствором серной кислоты.

Во многих случаях можно ограничиться определением общего азота и по нему рассчитать содержание белка. Однако при этом получают несколько завышенные данные, так как всегда в биологическом материале присутствуют небелковые азотсодержащие соединения (свободные аминокислоты и амиды и др.).

Реактивы и материалы:

- ♦ Мука, размолотое зерно, другой биологический материал;
- ♦ H_2SO_4 , концентрированная.
- ♦ K_2SO_4 и $CuSO_4$ (смесь 1 : 1).
- ♦ $NaOH$, 33 %-ный раствор.
- ♦ Комбинированный индикатор (метил-рот + метил-блау).
- ♦ H_2SO_4 , 0,05 н. раствор.
- ♦ $NaOH$, 0,05 н. раствор.

Методика проведения анализа. Навеску испытуемого материала, рассчитанную так, чтобы в ней содержалось 5...10 мг азота, количественно переносят в колбу Кьельдаля. Сухой измельченный материал обычно отвешивают на аналитических весах в длинной тонкой пробирке. Вещество из пробирки высыпают в колбу Кьельдаля (рис. 1.2) или в специальную тугоплавкую пробирку для сжигания.

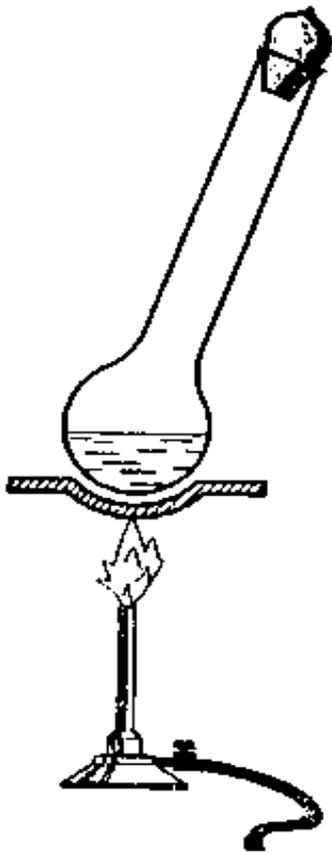


Рис. 1.2. Колба Кьельдаля

После этого пробирку вновь взвешивают и величину навески устанавливают по разнице между весом пробирки с веществом и пустой пробирки. При определении азота в жидком продукте пипеткой точно отмеряют необходимый объем и переносят его в колбу Кьельдаля или в специальную тугоплавкую пробирку для сжигания, не касаясь стенок. Приливают 5...10 см³ концентрированной серной кислоты и добавляют катализатор.

Сжигание сначала проводят при температуре 60...100 °С, при этом происходит обугливание вещества и смесь пенится. После того как смесь перестанет вспениваться, температуру повышают до слабого кипения содержимого колбы. Сжигание проводят до полного осветления жидкости, исчезновения бурой и появления голубоватой окраски, обусловленной присутствием меди.

Сжигание необходимо проводить под тягой, так как при этом выделяется диоксид серы. В комнате, где проводится сжигание, нельзя хранить аммиак и азотную кислоту, так как выделяющиеся аммиак и оксиды азота искажают результаты анализа.

Цель дальнейших операций — количественное определение азота органических соединений, связанного в виде сульфата аммония.

В приемный стаканчик отмеривают 20 см^3 0,05 н. серной кислоты, к которой добавляют 2...3 капли комбинированного индикатора и устанавливают стаканчик у отгонного аппарата таким образом, чтобы конец трубки холодильника был погружен в серную кислоту (рис. 1.3).

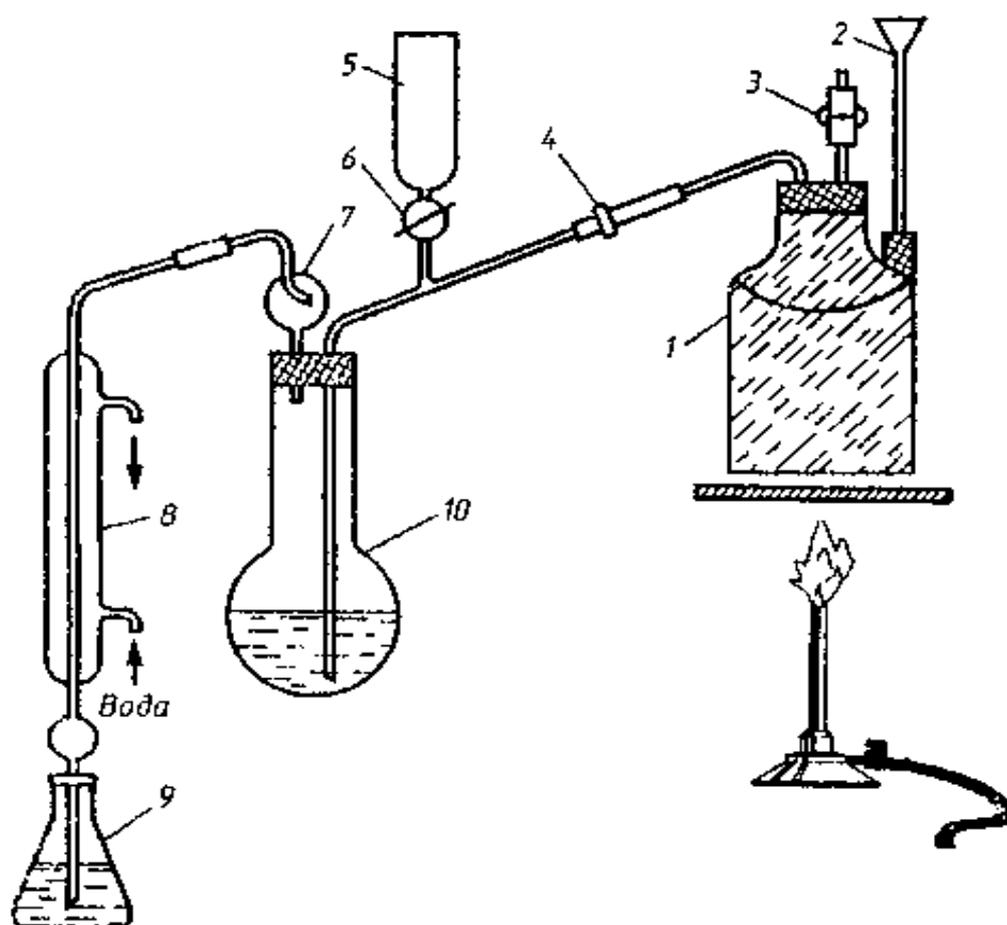


Рис. 1.3. Аппарат для отгонки аммиака:

1 — парообразователь; 2, 5 — воронки, 3, 6 — краны; 4 — зажим; 7 — каплеуловитель;
8 — холодильник; 9 — приемная колба; 10 — реакционный сосуд

В реакционный сосуд отгонного аппарата через воронку, снабженную краном, количественно переносят содержимое колбы Кьельдаля, обмывая несколько раз колбу небольшими порциями дистиллированной воды, промывные воды также переносят в реакционный сосуд. Добавляют концентрированный раствор щелочи ($30...50 \text{ см}^3$) до образования щелочной среды, воронку отгонного аппарата промывают водой от щелочи (при этом немного воды оставляют в воронке) и аппарат подключают к парообразователю. При интенсивном кипении отгонка основного количества аммиака заканчивается через 5...15 минут. Затем стаканчик с титрованным раствором кислоты опускают так, чтобы конец трубки холодильника был выше уровня жидкости. Отгонку продолжают еще 2...3 минуты, при этом стекающий дистиллят обмывает от кислоты внутренние стенки трубки холодильника, а с на-

ружной стороны конец трубки обмывают из промывалки. Конец отгонки определяют по реакции на лакмусовую бумажку отгоняемого дистиллята. В случае полной отгонки аммиака розовая лакмусовая бумажка не должна синеть.

Избыток серной кислоты, не связанный с аммиаком, титруют 0,05 н. раствором щелочи до нейтральной реакции (зеленоватый оттенок в присутствии комбинированного индикатора) и по разности узнают количество серной кислоты, связанной с аммиаком. Расчет азота ведут исходя из соотношения: 1 см³ 0,05 н. серной кислоты соответствует 0,7 мг азота. Содержание азота выражают в процентах к массе материала.

При определении азота следует ставить контроль на реактивы и затем величину азота в контроле вычитать из количества азота в опыте. При проведении контрольного определения берется то же количество реактивов, что и в опытном.

Определение белковых веществ на автоматическом анализаторе «Кельтек»

Аппарат состоит из установки для сжигания, дистиллятора со встроенным парогенератором, насосом для дозирования щелочи и контролером ее расхода, а также автоматического титратора.

Методика проведения анализа. К навеске массой 1,5 г добавляют 20 см³ 96 %-ной серной кислоты, смесь нагревают в течение 15 минут и проводят сжигание в течение 60 минут. В качестве катализатора используют таблетки следующего состава: 3,5 г K₂SO₄ + 0,4CuSO₄ · 5H₂O (1,5 г K₂SO₄ + 7,5 мг Se или 1,5 г K₂SO₄ + 0,15CuSO₄ · 5H₂O).

Для дистилляции в колбу, где проводилось сжигание, вносят 50 см³ бидистиллированной воды для растворения осадка и 70 см³ 30 %-ного раствора гидроксида натрия. В приемную колбу предварительно вносят 60 см³ 2 %-ного раствора борной кислоты. Титрование проводят серной кислотой с концентрацией 0,25 моль/дм³ с индикатором Sher до pH 4,65 или 0,1 н. соляной кислотой, используя в качестве индикатора бромкрезоловый зеленый, окраска изменяется до серо-синего цвета.

1.2.2. Определение белкового и небелкового азота по методу Кьельдаля

Небелковые соединения хорошо растворяются в воде и, в отличие от белков, не осаждаются белковыми осадителями. При обработке ис-

пытуемого материала белковым осадителем белок переходит в осадок, а небелковые азотсодержащие соединения остаются в надосадочной жидкости. В качестве белковых осадителей широко используются: реактив Барнштейна, состоящий из равных объемов 6 %-ной CuSO_4 и 1,25 %-ной NaOH ; а также 10 или 20 %-ные растворы ТХУ.

С помощью фильтра отделяют осадок от раствора и определяют азот белковый (в осадке) и азот небелковый (в фильтрате).

Количество белкового азота пересчитывают на белок с помощью коэффициентов. Универсальный белковый коэффициент 6,25 (принят на основании того, что среднее содержание азота в большинстве белков 16 %, отсюда $100/16 = 6,25$). Уточненные белковые коэффициенты для некоторых объектов, с учетом фактического содержания белка в них, следующие: 5,7 — пшеница, рожь, ячмень, овес, семена подсолнечника; 5,8 — соя; 6,25 — кукуруза; 6,38 — молоко и молочные продукты.

1.2.3. Определение белка по методу Лоури

Определение белка по методу Лоури основано на комбинации биуретового метода (образование окрашенного комплекса пептидных связей с медью) и метода Фолина (образование окрашенного комплекса реактива Фолина с ароматическими аминокислотами).

Метод Лоури имеет ряд преимуществ, в сравнении с двумя выше-названными методами. Комбинированный метод Лоури в 100 раз чувствительнее биуретовой реакции, и точность определений мало зависит от состава белка. Метод прост и удобен для серийных анализов.

Реактивы:

A. 2 %-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. NaOH .

B. 0,5 %-ный $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 %-ном растворе виннокислого натрия.

C. 50 мл *A* + 1 мл *B* (годен в течение одного дня).

D. Разбавленный реактив Фолина.

Методика проведения анализа. 0,4 см³ испытуемого раствора белка (50...500 мг) и 2 см³ реактива *C* перемешивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляют 0,2 см³ реактива *D*, очень быстро перемешивают (в течение 1...2 секунд) и оставляют на 30...40 минут при комнатной температуре для развития окраски. По истечении указанного времени интенсивность окраски образовавшегося комплекса измеряют на ФЭКе при красном светофильтре или на

спектрофотометре при 760 нм. Содержание белка определяют по калибровочной кривой.

Определению белка по методу Лоури мешают: мочевая кислота, гуанин и гликокол, ксантин, серноокислый аммоний при массовой доле в среде более 5 %.

Определению белка по методу Лоури не мешают: Na_2SO_4 (меньше 1 %), трихлоруксусная кислота (меньше 0,5 %), этанол (меньше 5 %), серный эфир (меньше 5 %), ацетон (меньше 0,5 %).

1.2.4. Определение белка с кумасси синим по Бредфорду

Метод основан на связывании с белками одного из кислых красителей кумасси синего, выпускаемого в двух модификациях: R-250 и G-250. При связывании с белками спектр поглощения красителя меняется; интенсивность окраски в диапазоне 1...10 мкг/см³ имеет линейную зависимость от концентрации белка в пробе.

Поскольку белки различаются по своей способности связывать красители, желательно для построения калибровочной кривой использовать в качестве стандартного белка белок, концентрацию которого в дальнейшем предполагается определять.

Реактивы и материалы:

- ♦ Стандартный раствор белка, содержащий 0,05 мг в 1 см³.
- ♦ Раствор красителя. 10 мг красителя (Coomassie brilliant blue G) растворяют в 5 см³ 95 %-ного спирта. Полученный раствор смешивают с 10 см³ 95 %-ной фосфорной кислоты и доводят водой до конечного объема 100 см³. Отфильтрованный раствор красителя хранится при комнатной температуре в течение двух недель.

Методика проведения анализа. 1,5 см³ раствора, содержащего от 10 до 50 мкг белка, смешивают с 1,5 см³ раствора красителя. Через 5 минут измеряют оптическую плотность при 595 нм. В качестве контроля используют пробу, не содержащую белка.

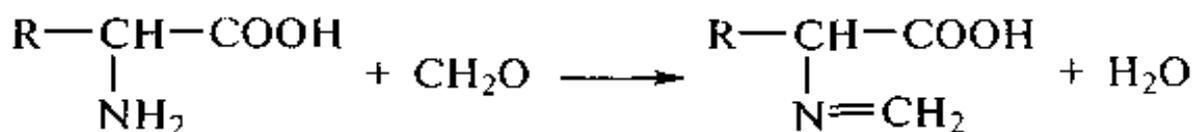
В описанной модификации метода оптическая плотность A_{595} линейно зависит от количества белка в интервале от 10 до 50 мкг.

Определению белка по методу Бредфорда мешают: амфолины, которые вызывают увеличение оптической плотности, и не мешают: фосфаты, ацетаты, HEPES, трис, дитиотреитол, глицин, тирозин, аденозин, АТФ, тимидин, ДНК, РНК, они не влияют на развитие окраски растворов.

1.2.5. Определение аминного азота методом формольного титрования

В производственной практике широко пользуются показателем «аминный азот», который отражает преимущественно содержание аминокрупп аминокислот и низкомолекулярных пептидов.

В основе метода определения аминного азота формольным титрованием лежит взаимодействие аминокислоты с формалином, в результате которого образуются метиленовые соединения, представляющие собой кислоты:



Образовавшиеся кислоты могут быть оттитрованы щелочью. Реакция протекает в соответствии со следующим уравнением:



Содержание аминных групп рассчитывают по количеству щелочи, израсходованной на титрование.

Реактивы и материалы:

- ♦ Формалин — 40 %-ный раствор.
- ♦ 1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина.
- ♦ NaOH — 0,05 н. раствор.
- ♦ Индикатор — бромтимоловый синий.

Методика проведения анализа. К 20 см³ испытуемого раствора (2 см³ образца + 8 см³ воды) и к 20 см³ дистиллированной воды (контроль) добавляют 5 капель индикатора (бромтимоловый синий). При этом раствор окрашивается в желтый цвет, затем добавляют 0,05 н. NaOH до желто-зеленой окраски (pH 7,0). К нейтрализованному раствору прибавляют 2 см³ формольной смеси (50 см³ 40 %-ного раствора формалина и 2 см³ 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина), после чего раствор титруют 0,05 н. NaOH до ярко-синего окрашивания (pH 9,7). Расчет аминного азота ведут по формуле:

$$X = (a - b) \cdot T \cdot 0,7,$$

где X — количество аминного азота, содержащегося в 2 см³ исследуемого образца;
 a — количество см³ 0,05 н. NaOH, израсходованного на титрование испытуемого

образца; b — количество см^3 0,05 н. NaOH, израсходованного на титрование контрольного образца; T — поправка к титру; 0,7 — коэффициент пересчета, при использовании 0,05 н. NaOH (1 см^3 0,05 н. NaOH соответствует $14 \cdot 0,05 = 0,7$).

1.2.6. Определение аминного азота («медный способ»)

Метод основан на способности большинства аминокислот и пептидов образовывать с медью растворимые комплексные соединения. Избыток меди отфильтровывают, а ее количество, эквивалентное аминному азоту, уксусной кислотой переводят в соль уксусной кислоты и количественно определяют йодометрическим титрованием.

Реактивы и материалы:

- ♦ Раствор хлорной меди (27,3 г хлорной меди растворяют в 1 дм^3 дистиллированной воды).

- ♦ Раствор трехзамещенного фосфата натрия (64,5 г двухзамещенного фосфата натрия растворяют в 500 см^3 воды, добавляют 7,2 г гидроксида натрия, а после растворения объем доводят водой до 1 дм^3).

- ♦ Боратный буферный раствор (57,21 г буры растворяют в $1,5 \text{ дм}^3$, добавляют 100 см^3 1 н. раствора соляной кислоты и объем доводят водой до 2 дм^3).

- ♦ Суспензия фосфорнокислой меди (1 объем хлорной меди + 2 объема раствора фосфата натрия + 2 объема раствора боратного буфера).

- ♦ Раствор тимолфталейна (0,25 г тимолфталейна растворяют в 100 см^3 50 % этилового спирта).

- ♦ 0,01 н. раствор тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) — годен в течение одного дня.

- ♦ 80 %-ная уксусная кислота.

- ♦ 1 %-ный раствор крахмала.

Методика проведения анализа. В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 испытуемого раствора, прибавляют 3...4 капли тимолфталейна и 1 н. раствор гидроксида натрия до бледно-голубого окрашивания. При непрерывном перемешивании осторожно приливают 30 см^3 суспензии фосфорнокислой меди и доводят до метки дистиллированной водой. Смесь после тщательного перемешивания фильтруют через бумажный фильтр, первые порции фильтрата возвращают на фильтр.

10 см^3 прозрачного фильтрата подкисляют $0,5 \text{ см}^3$ 80 %-ной уксусной кислоты, прибавляют к нему 1 г йодистого калия и после размешивания оттитровывают выделившийся йод 0,01 н. раствором тио-

сульфата натрия. В конце титрования добавляют 1...2 капли раствора крахмала. Титрование заканчивают при обесцвечивании раствора от одной капли тиосульфата натрия.

При проведении расчета учитывают, что 1 см³ 0,01 н. раствора тиосульфата натрия соответствует 0,28 мг азота.

Количество аминного азота (N , мг) в 100 см³ исследуемого раствора вычисляют по формуле:

$$N = a \cdot 0,28 \cdot 5 \cdot 10,$$

где a — количество 0,01 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование выделившегося йода, см³.

1.3. МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

Для белковых смесей, находящихся в растворе, широкое применение получили методы дробного осаждения, основанные на изменении растворимости белков в присутствии растворов солей и органических растворителей, в изоэлектрической точке.

В последние годы все чаще находят применение различные виды хроматографии и электрофореза, детальное описание которых приводится в специальной методической литературе. В данном руководстве приводятся лишь общие принципы, положенные в основу различных хроматографических и электрофоретических методов. Описание метода гель-хроматографии рассматривается более подробно, так как этот метод предлагается использовать для разделения веществ по молекулярной массе при проведении лабораторных работ по курсу «Пищевая химия» (см. п. 1.4, с. 34).

1.3.1. Метод гель-хроматографии

Метод гель-хроматографии (гель-фильтрации) — фракционирование смеси компонентов по размерам молекул при прохождении через гели с определенной величиной пор обычно проводится в виде колоночной хроматографии.

На рис. 1.4 представлены возможные конструкции колонок, а на рис. 1.5 схема устройства для колоночной хроматографии.

Наиболее широкое распространение среди носителей для гель-хроматографии белков получили сорбенты, приготовленные на осно-

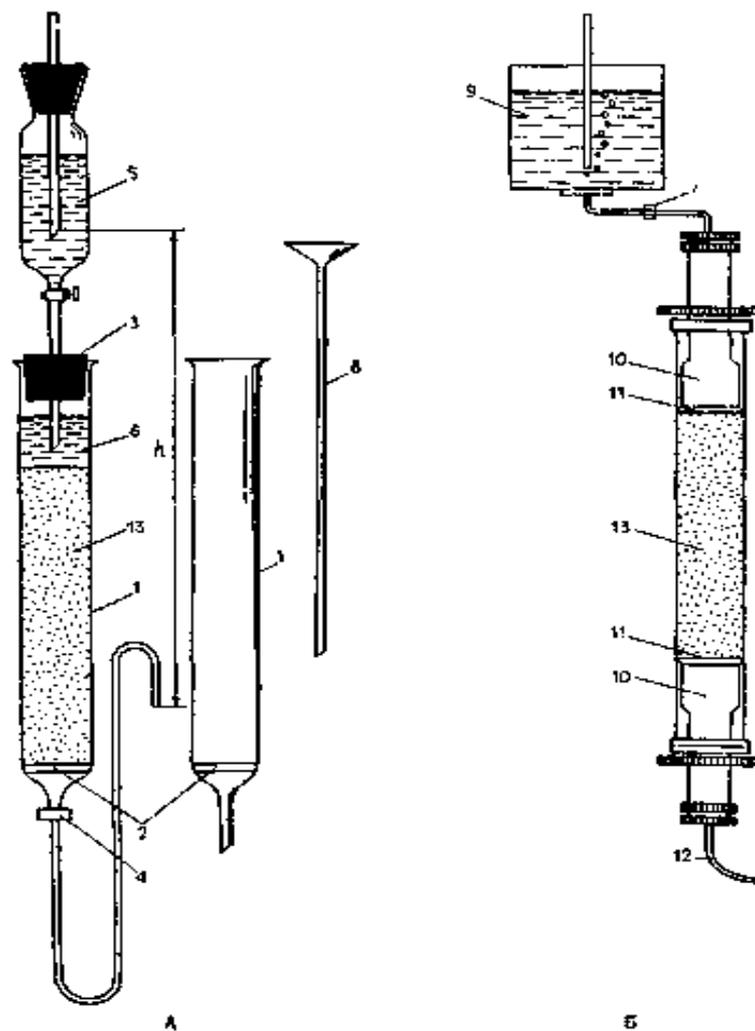


Рис. 1.4. Хроматографические колонки упрощенного (А) и усложненного (Б) типа:

1 — стеклянная колонка; 2 — перфорированный диск; 3 — пробка со стеклянной трубкой; 4, 7 — кран зажим; 5, 9 — верхний резервуар 6 — раствор над гелем 8 — стеклянный поршень 10 — адаптеры; 11 — сетка из нейлона 12 — капиллярный шланг, соединенный с регистрирующим устройством или коллектором фракций

ве декстрана (сефадексы, сефакрилы, молселекты), полиакриламида (биогели Р, акрилексы) и агарозы (сефарозы, биогели А) и др.

Сефадексы — продукты взаимодействия полисахарида декстрана с эпихлоргидрином. Они устойчивы к органическим растворителям, растворам щелочей и разбавленных кислот (до 0,1 н.). Рабочий диапазон рН составляет от 2 до 10. Марки сефадексов G-10, 15, 25, 50, 75, 100, 200 различаются степенью сшивания поперечными связями и связанной с ней способностью к поглощению воды, а также размерами пор в гранулах (прил. 7, с. 297).

Для приготовления геля сухой сефадекс суспендируют в воде или буферном растворе и оставляют для набухания (см. прил. 7, с. 297).

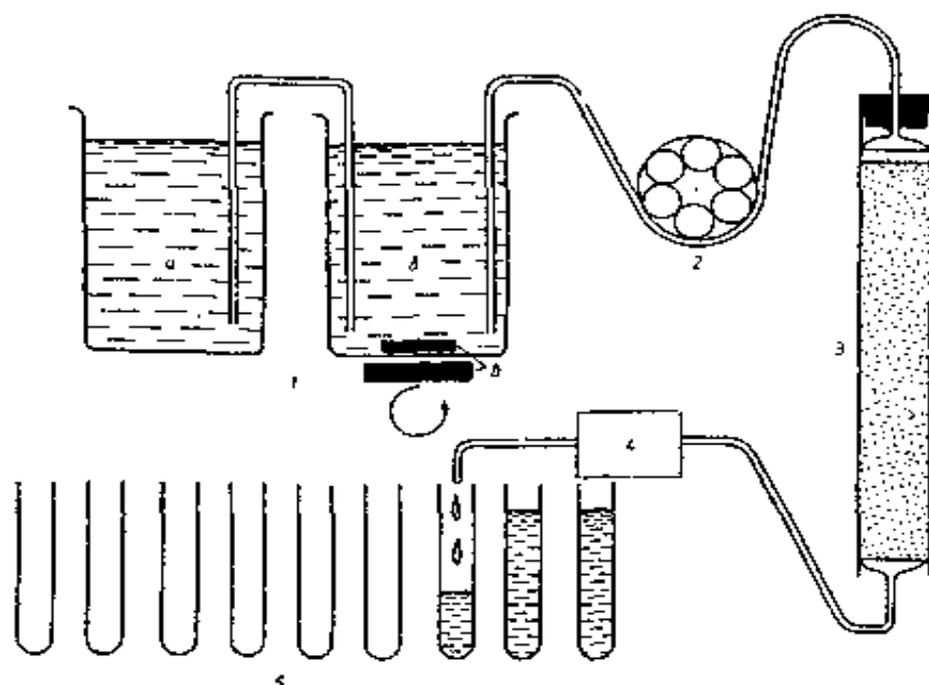


Рис. 1.5. Схема устройства для колоночной хроматографии:
1 — прибор для создания линейного градиента (а — сосуд с раствором высокой концентрации, б — сосуд-смеситель, в — магнитная мешалка); 2 — перистальтический насос; 3 — колонка; 4 — УФ-детектор; 5 — коллектор фракций

Принцип работы сефадекса следующий. Колонка, заполненная предварительно набухшим гелем сефадекса, содержит 2 вида объемов жидкости: внутренний ($V_{вн}$), заполняющий гранулы сефадекса и свободный ($V_{св}$), заполняющий пространство между гранулами. Общий объем колонки ($V_{общ}$) равен сумме внутреннего и свободного объемов.

$$V_{общ} = V_{вн} + V_{св}$$

При пропускании смеси веществ через колонку *крупные молекулы*, превышающие по своим размерам поры гранул, размещаются между гранулами в свободном объеме. Молекулы *меньшего размера* проникают через поры внутрь гранул и располагаются как в свободном, так и во внутреннем объеме (рис. 1.6).

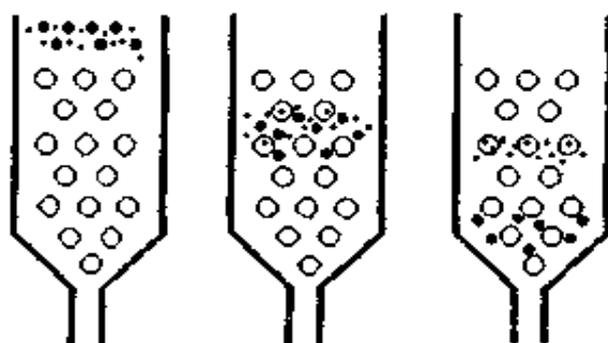


Рис. 1.6. Разделение веществ на колонке с сефадексом

Объем элюата, с которым вещество выходит с колонки ($V_{эл}$), зависит от распределения вещества между $V_{св}$ и $V_{вн}$:

$$V_{эл} = V_{св} + k \cdot V_{вн}$$

где k — коэффициент распределения.

1. Вещества, для которых $k = 0$, не проникают в гранулы геля и выходят с колонки со свободным объемом:

$$V_{\text{эл}} = V_{\text{св}}$$

2. Вещества, для которых $k = 1$, равномерно распределяются внутри и вне гранул и выходят с колонки с $V_{\text{общ}}$:

$$V_{\text{эл}} = V_{\text{св}} + 1 \cdot V_{\text{вн}} = V_{\text{общ}}$$

3. Вещества, для которых $0 < k < 1$, лишь частично проникают в гранулы и извлекаются с объемом элюции большим свободного и меньшим общего объема колонки:

$$V_{\text{св}} < V_{\text{эл}} < V_{\text{общ}}$$

Разделение веществ происходит в объеме:

$$V_{\text{общ}} - V_{\text{св}}$$

Такое разделение наблюдается только в том случае, когда сефадекс по отношению к разделяемым веществам является нейтральной матрицей, т. е. не взаимодействует с ними. В тех случаях, когда разделяемые вещества взаимодействуют с матрицей (сорбция, ионные силы и т. д.), как, например, ароматические соединения, они задерживаются на колонке и выходят с объемом элюции, который больше общего объема колонки.

Таким образом, сефадекс работает как «молекулярное сито», фракционируя вещества по молекулярной массе.

Сефадексы применяют:

- ♦ для обессоливания (т. е. отделения высокомолекулярных соединений от низкомолекулярных);
- ♦ для смены буфера;
- ♦ для разделения высокомолекулярных соединений (белков, углеводов) с различной молекулярной массой;
- ♦ для определения молекулярной массы;
- ♦ для концентрирования растворов высокомолекулярных соединений, основанного на способности сефадексов к набуханию.

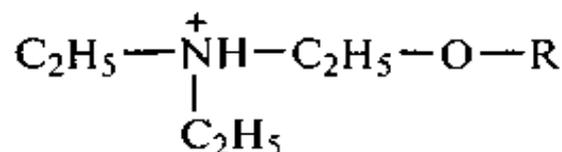
1.3.2. Метод ионообменной хроматографии

Методом ионообменной хроматографии разделяют белки или аминокислоты на основе различий в общем заряде молекул. Разделение веществ с помощью ионообменной хроматографии проводят на ко-

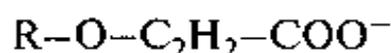
лонках, заполненных ионообменной смолой (катионо- или анионообменники).

В качестве нерастворимого носителя в ионообменной хроматографии чаще всего используются:

♦ ДЭАЭ-целлюлоза (диэтиламиноэтилцеллюлоза) — анионообменник, содержащий при pH 7,0 положительно заряженные группы:



♦ КМ-целлюлоза (карбоксиметилцеллюлоза) — катионообменник, содержащий отрицательно заряженные группы:



Если белок имеет положительный заряд, то он связывается с катионообменником, если отрицательный — то с анионообменником. Положительно заряженный белок снимается с колонки путем добавления в элюирующий буфер хлористого натрия или другой соли. При этом создают градиент концентрации NaCl. Ионы Na^+ конкурируют с заряженными группами белков за места связывания с адсорбентом. Те белки, у которых плотность заряда ниже, элюируются с колонки первыми, за ними следуют белки с более высокой плотностью заряда. Элюируемые белки фракционируют на коллекторе фракций и исследуют.

Метод ионообменной хроматографии нашел применение для разделения белков, очистки ферментов и лежит в основе определения аминокислотного состава белков с помощью автоматического аминокислотного анализатора.

1.3.3. Метод аффинной хроматографии

Аффинная хроматография (или биоспецифическая хроматография по сродству) основана на особенности биологически активных веществ специфически и обратимо связывать другие вещества, называемые лигандами.

Лиганд ковалентно связывают с нерастворимой матрицей, в качестве которой чаще всего используют различные типы сефарозы. Через колонку, заполненную этим адсорбентом, пропускают смесь различных белков. Все белки, не обнаруживающие сродства к данному ли-

ганду, будут проходить через колонку не задерживаясь, и только тот белок, который имеет сродство к данному лиганду, будет адсорбироваться на колонке. Адсорбированный белок освобождают из комплекса с иммобилизованным лигандом путем изменения pH, ионной силы или с помощью специфических агентов.

Преимущество этого метода состоит в том, что его использование позволяет отказаться от многостадийных, трудоемких схем выделения и получить белок с высокой степенью очистки практически в одну стадию. Метод аффинной хроматографии применяется в исследовательской практике для выделения ферментов, их белковых ингибиторов, а также транспортных белков, гормонов, антител и антигенов, и др.

1.3.4. Электрофоретическое разделение белков

Метод основан на том, что молекулы белка обладают электрическим зарядом, величина и знак которого определяются аминокислотным составом, pH, ионной силой окружающей среды. В электрическом поле постоянного тока белки движутся к аноду либо к катоду в зависимости от знака своего заряда. Скорость движения определяется величиной заряда.

Существует большое количество вариантов электрофоретического разделения белков. Они классифицируются в зависимости от типа электролитической системы, типа носителя, конструкции аппаратуры и способа обнаружения разделяемых белковых фракций.

1.3.5. Изоэлектрическое фокусирование белков

Метод изоэлектрического фокусирования позволяет разделять белки, различающиеся изоэлектрическими точками. Изоэлектрическая точка белка (pI) — это значение pH, при котором молекула белка электронейтральна, т. е. имеет место равенство положительных и отрицательных зарядов. Фракционирование белков проводится в градиенте pH, создаваемом смесью низкомолекулярных амфилинов, представляющих собой алифатические полиаминополикарбоновые кислоты.

Метод изоэлектрического фокусирования включает электрофоретическую миграцию белка в условиях градиента pH. Белок движется

под действием электрического поля, пока не достигнет такой области, где рН равен рI белка. Суммарный заряд белка становится равным нулю и белок концентрируется в этой области в виде узкой зоны.

В работе используют стандартную колонку объемом 110 см³. Для предотвращения перемешивания зон, разделение ведут в градиенте плотности сахарозы. Колонку заполняют с помощью перистальтического насоса и смесителя. Скорость заполнения колонки — 100 см³/ч. При разделении белков на амфолине в диапазоне рН 3...10 рабочее напряжение составляет 300 В.

При подаче напряжения на колонку молекулы белка мигрируют в зоны, в которых значения рН соответствует их изоэлектрическим точкам. Разделение сопровождается постепенным уменьшением тока, и длительность разделения при таком диапазоне рН составляет около трех суток.

После разделения содержимое колонки фракционируют по 5 см³ со скоростью 50 см³ в час. В собранных фракциях регистрируют содержание белка и рН.

Метод изоэлектрического фокусирования обладает высокой разрешающей способностью, позволяя разделять белки, у которых рI отличаются всего на 0,02 единицы рН.

1.3.6. Определение аминокислотного состава белков с помощью аминокислотного анализатора

В основе определения аминокислотного состава с помощью аминокислотного анализатора лежит метод ионообменной хроматографии. Для определения аминокислотного состава белка проводят его гидролиз 6 н. соляной кислотой при стандартных условиях в атмосфере азота в запаянных ампулах при $(100 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. Хроматографию аминокислот проводят в соответствии с инструкцией к прибору. Содержание аминокислот определяют в сравнении со стандартной хроматограммой аминокислот-метчиков.

Для определения свободных аминокислот проводят предварительную депротенизацию образца. Для этого к исследуемому образцу добавляют равное количество 20 %-ного раствора ТХУ и через 20 мин центрифугируют при 4...6 тыс. об/мин в течение 15...20 мин. Так, например, для хроматографии на аминокислотном анализаторе «МультиХром Hitachi-850» (Япония) надосадочную жидкость разводят из расчета содержания аминного азота 4...5 мг на 100 см³.

1.4. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 1.4.1

Построение калибровочной кривой для определения белка по методу Лоури

В исследовательской практике и практике производства и контроля качества пищевых продуктов необходимость количественного определения содержания белка в большом количестве образцов возникает достаточно часто, и связи с этим использование чувствительного колориметрического метода Лоури является очень удобным.

Цель работы: построение калибровочной кривой для определения содержания белка по методу Лоури.

Реактивы и материалы:

- ♦ Гемоглобин, альбумин или препарат другого стандартного белка.
- ♦ Реактивы для определения белка по методу Лоури.
- ♦ Реактивы для определения белка по методу Кьельдаля.

Приготовление исходного раствора белка

Для построения калибровочной кривой необходимо использовать по возможности наиболее чистые и однородные препараты стандартного белка (кристаллические препараты гемоглобина, бычьего сывороточного альбумина и др.). Желательно, чтобы по химической природе этот белок был достаточно близким к исследуемому белку.

Для приготовления исходного раствора белка взвешивают на технических весах 0,1 г стандартного белка и растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. При необходимости раствор фильтруют.

Определение концентрации белка в исходном растворе

Точную концентрацию приготовленного раствора устанавливают по методу Кьельдаля. Для этого берут на сжигание в колбы Кьельдаля три пробы исходного раствора белка по 5 см³ (дальнейшие операции определения белка по Кьельдалю см. п. 1.2.1, с. 19).

При пересчете содержания азота на белок используют универсальный белковый коэффициент — 6,25.

Содержание белка в исходном растворе рассчитывают как среднее арифметическое из трех параллельных определений. При значитель-

ных отклонениях полученных данных расчет ведут по данным двух наиболее близких результатов.

Приготовление растворов с меньшей концентрацией белка

Из исходного раствора методом разведения готовят растворы с меньшим содержанием белка по приведенной ниже схеме. Для этого условно принимают концентрацию исходного раствора белка за 100 единиц:

Раствор	Единицы белка
Исходный раствор	100
8 см ³ раствора 1 + 2 см ³ воды	80
7 см ³ раствора 1 + 3 см ³ воды	70
6 см ³ раствора 1 + 4 см ³ воды	60
5 см ³ раствора 1 + 5 см ³ воды	50
5 см ³ раствора 2 + 5 см ³ воды	40
5 см ³ раствора 3 + 5 см ³ воды	35
5 см ³ раствора 4 + 5 см ³ воды	30
5 см ³ раствора 5 + 5 см ³ воды	25
5 см ³ раствора 6 + 5 см ³ воды	20
5 см ³ раствора 8 + 5 см ³ воды	15
5 см ³ раствора 10 + 5 см ³ воды	10
3 см ³ раствора 11 + 6 см ³ воды	5

Определение белка по методу Лоури

Во всех приготовленных растворах проводят определение по методу Лоури (п. 1.2.3, с. 23).

В качестве контроля используют пробу, в которой вместо раствора белка используется дистиллированная вода.

Результаты заносят в таблицу по образцу табл. 1.1.

Таблица 1.1

Результаты определения белка по методу Лоури

Номер пробирки	Белок, усл. ед.	Белок, мг/см ³	Оптическая плотность (A)		
			4	5	6
1	2	3			

Для получения надежных результатов работу дублируют несколько раз, поручая группе из 2...3 студентов построение калибровочной кри-

вой. При этом студенты должны пользоваться одними и теми же растворами белка, приготовленными для всей группы.

Построение калибровочной кривой

По полученным данным строят калибровочную кривую в координатах: «оптическая плотность — концентрация белка, мг/см³». При построении графика учитываются все полученные в работе результаты. Калибровочная кривая используется для определения белка при выполнении других работ.

Лабораторная работа 1.4.2

Экстракция и осаждение белков

Выделение белков из биологического материала начинают с разрушения клеточной структуры, в результате чего белки переходят в экстрагирующий раствор. Для экстракции обычно используют воду, буферные растворы, слабый раствор щелочи. Вид экстрагента и условия экстрагирования позволяет перевести в раствор определенные группы белков.

На следующем этапе проводят разделение белков, осаждавая определенные группы белков различными способами, которые выбирают в зависимости от цели и особенностями объекта исследования:

- ♦ Отделить белки от пептидов и аминокислот можно путем их осаждения «белковыми осадителями», например трихлоруксусной кислотой (ТХУ). При этом происходит необратимая денатурация белков.

- ♦ Термолабильные белки можно отделить от термостабильных, используя тепловую обработку. Этот способ может применяться в тех случаях, когда не требуется сохранить нативную структуру белков или когда заранее известно термостабильность выделяемого белка.

- ♦ Белки в нативном состоянии можно перевести в осадок при разной концентрации соли. Постепенное увеличение ее концентрации дает возможность получить отдельные белковые фракции, например фракцию с ферментативной активностью, при этом добиться удаления значительной части балластных белков.

При солевом фракционировании в белковой химии часто используют насыщенные растворы сульфата аммония, действие которого в качестве осаждающего агента очень эффективно. Концентрацию сульфата аммония, при которой происходит высаливание, выражают в процентах насыщения, принимая концентрацию насыщенного раствора за 100%.

При растворении сульфата аммония меняется объем раствора, поэтому количество соли, которое нужно добавить к данному объему жидкости, не пропорционально требуемому проценту насыщения. Практически для расчета количества сульфата аммония, необходимого для создания заданной степени насыщения, пользуются таблицами или номограммами.

Изменение рН белкового раствора позволяет провести избирательное осаждение белков (осаждение в изоэлектрической точке). При этом способе осаждения обычно сохраняется нативная структура белков, как в осадке, так и в надосадочной жидкости. Изменение рН белкового раствора следует проводить осторожно, по возможности не использовать сильные кислоты и щелочи.

Цель работы: выбор оптимальных условий экстракции и осаждения белков из различных объектов.

Реактивы и материалы:

- ♦ Пшеница, горох, солод, клубни картофеля.
- ♦ 0,1 н. HCl.
- ♦ 10 %-ный раствор ТХУ.
- ♦ Na_2CO_3 .
- ♦ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, насыщенный раствор.
- ♦ Реактивы для определения белка по Лоури.

Методика проведения анализа. Работа проводится в несколько этапов:

1. Зерно и солод измельчают на лабораторной мельничке, клубни картофеля измельчают на терке и отжимают сок.

2. Экстракцию белков из зернового сырья осуществляют водой или 0,35 %-ным раствором соды.

10 г измельченного материала экстрагируют 150 см³ выбранного экстрагента при интенсивном перемешивании на мешалке в течение 3 минут. Растворенные белки отделяют от осадка центрифугированием. Надосадочную жидкость используют в опытах по осаждению белков.

1. Осаждение белков раствором ТХУ. В пробирки вносят растворы в количествах, указанных в табл. 1.2.

Содержимое пробирок встряхивают и оставляют на 20 минут для формирования осадка. Если осадок не формируется, пробирки прогревают на водяной бане при температуре 40 °С.

В надосадочной жидкости после фильтрования определяют содержание белка по методу Лоури. При необходимости испытуемый раствор разводят в 2 или 4 раза. Полученные результаты вносят таблицу (см. табл. 1.2) и строят график осаждения белка нарастающими кон-

Таблица 1.2

Данные для построения графика осаждения белка раствором ТХУ

№ п/п	Раствор белка, см ³	Н ₂ О, см ³	ТХУ, см ³	Кратность разведения исходного раствора	Оптическая плотность А	Содержание белка, мг/см ³	
						в исходной жидкости	в осадке
1	5	5	0				0
2	5	4	1				
3	5	3	2				
4	5	2	3				
5	5	0	5				

центрациями ТХУ. Определяют концентрацию ТХУ, достаточную для максимального осаждения белков.

2. Осаждение белков при изменении рН среды. В пробирки вносят растворы в количествах, указанных в табл. 1.3.

Таблица 1.3

Данные для построения графика осаждения белка при изменении рН среды

№ п/п	Раствор белка, см ³	Н ₂ О, см ³	0,1 н. НСl, см ³	Кратность разведения исходного раствора	Оптическая плотность А	Содержание белка, мг/см ³
1	5	5	0			
2	5	3	2			
3	5	2	3			
4	5	1	4			
5	5	0	5			

В пробирки с раствором белка вначале вносят заданное количество соляной кислоты, содержимое пробирок встряхивают и оставляют на 20 минут для формирования осадка. Затем вносят необходимое количество воды для компенсации объема. Пробирки повторно встряхивают и содержимое фильтруют через сухой фильтр. В фильтрате определяют белок по Лоури. При необходимости фильтрат предварительно разводят водой в 5 или 10 раз. Полученные данные вносят в таблицу (табл. 1.3) и строят график.

3. Осаждение белков насыщенным раствором (NH₄)₂SO₄. В пробирки вносят растворы в количествах, указанных в табл. 1.4.

Таблица 1.4

Данные для построения графика осаждения белка раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

№ п/п	Раствор белка, см	H_2O , см ³	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ насыщ., см ³	Оптическая плотность, А	Содержание белка, мг/см ³	
					в налосалочной жидкости	в осадке
1	5	5	0			0
2	5	4	1			
3	5	3	2			
4	5	2	3			
5	5	0	5			

Содержимое пробирок встряхивают и оставляют на 30 минут для формирования осадка при температуре 2...4°C. В налосалочной жидкости после фильтрования определяют содержание белка по методу Льюри. При необходимости исплтуемый раствор разводят в 2 или 4 раза.

Полученные результаты вносят в таблицу (табл. 1.4) и по ним строят график осаждения белка нарастающими концентрациями $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Лабораторная работа 1.4.3

Калибровка колонки с сефадексом G-50

Перед фракционированием веществ методом гель-хроматографии колонку необходимо правильно заполнить сефадексом и откалибровать — установить свободный, общий объемы колонки и область разделения веществ.

При использовании гель-хроматографии для определения молекулярной массы веществ необходимо также маркировать колонку с использованием стандартных белковых метчиков (белки с известной молекулярной массой) и построением калибровочной кривой в координатах « $V_{эл} / V_{св}$ — логарифм молекулярной массы».

Цель работы: познакомиться с техникой заполнения и нанесения образцов на колонку при проведении гель-хроматографии. Установить свободный и общий объем колонки и область, в которой происходит разделение веществ по молекулярной массе.

Реактивы и материалы:

- ♦ Сефадекс G-50.
- ♦ 0,9 %-ный раствор NaCl — элюирующий раствор.
- ♦ Декстран синий.

- ♦ Бихромат калия.
- ♦ Сахароза.

Методика проведения анализа.

1. Заполнение колонки сефадексом. Основным условием хорошего разделения белков с помощью гель-хроматографии является правильное заполнение колонки.

Колонку (размером $2,0 \times 50$ см) укрепляют на штативе строго вертикально, в основание помещают либо небольшое количество стекловаты, либо диск из мелкопористого поролона, на который сверху помещают кружок фильтровальной бумаги. Порошок сефадекса предварительно замачивают в воде или рабочем буфере, в зависимости от свойств сефадекса и объема колонки (см. п. 1.2.5, с. 25). Например, для набухания 1 г сефадекса G-50 необходимо 5 см^3 воды.

Перед заполнением колонке набухшим сефадексом, в нее наливают небольшое количество элюирующей жидкости (вода, буферный раствор и т. п.) и удаляют пузырьки воздуха. После этого колонку начинают заполнять: медленно тонкой струей приливая густую взвесь сефадекса. Открывают зажим и по мере уплотнения геля, продолжают заполнять колонку, не допуская попадания воздуха. Слой сефадекса в колонке должен быть горизонтальным, на него можно положить кружок фильтровальной бумаги, его подсыхание не допускается.

Нанесение образцов на колонку проводят двумя способами:

- ♦ Нанесение образца под слой элюирующей жидкости, при этом образец утяжеляют, например, сахарозой. Для этого над поверхностью сефадекса оставляют примерно 1 см жидкости и утяжеленный образец осторожно наносят на сефадекс, стараясь не нарушать верхний слой.

- ♦ Нанесение образца на слой сефадекса. Для этого над слоем сефадекса оставляют 1...2 мм жидкости и осторожно круговыми движениями наслаивают образец и открывают зажим. После проникновения образца в гель постепенно наслаивают элюирующую жидкость.

2. Калибровка колонки. Колонку, заполненную набухшим сефадексом G-50, необходимо откалибровать, т. е. установить $V_{\text{св}}$ и $V_{\text{общ}}$. Для этой цели используют смесь высокомолекулярного вещества ($k = 0$), выходящего со свободным объемом ($V_{\text{св}}$) — декстрана синего (молекулярная масса около 2 млн Дальтон) и низкомолекулярного вещества, выходящего с объемом элюции, равным $V_{\text{общ}}$ — тирозина. В этом случае регистрацию веществ проводят спектрофотометрически при 280 нм. Использование в качестве последнего бихромата калия позволяет визуально контролировать прохождение и выход веществ при калибровке колонки.

На колонку наносят 3 см^3 смеси. Нанесение образца проводят под слой жидкости (для этого образец утяжеляют сахарозой). Элюцию ведут 0,9 %-ным раствором NaCl. После нанесения образца открывают зажим и собирают элюат фракциями по 5 см^3 . Отбор фракций заканчивают после выхода бихромата калия. Для расчета параметров колонки строят диаграмму элюции, откладывая по оси абсцисс объем элюции, а по оси ординат — концентрацию вещества во фракциях (рис. 1.7).

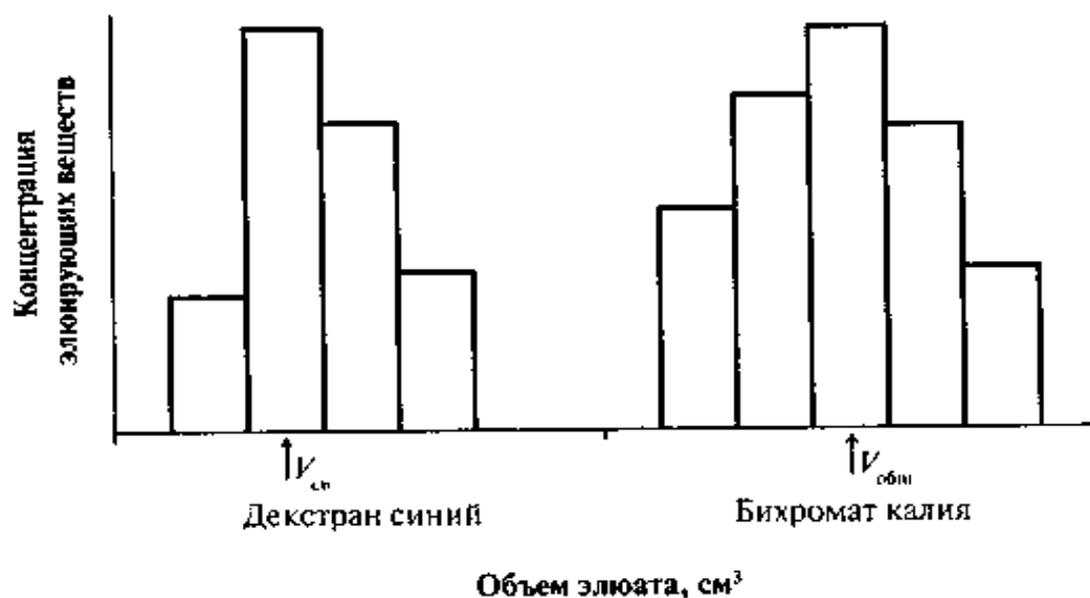


Рис. 1.7. Диаграмма элюции при калибровке колонки

Лабораторная работа 1.4.4

Фракционирование веществ методом гель-хроматографии через сефадекс

Цель работы: познакомиться с техникой работы на колонке при проведении гель-хроматографии. Провести фракционирование белков водного экстракта солода. Выявить фракции, обладающие амилазной активностью.

Реактивы и материалы:

- ♦ Ячменный или пшеничный солод.
- ♦ Раствора крахмала (2 мг/см^3).
- ♦ 0,1 н. HCl.
- ♦ Реактивы для определения белка по Лоури.
- ♦ Реактив Фелинга (смесь равных объемов 4 %-ного раствора CuSO_4 и щелочного раствора сегнетовой соли).

Подготовка образца

К 5 г измельченного материала (пшеничный или ячменный солод) добавляют 50 см³ дистиллированной воды. Затем в течение 5 минут подвергают интенсивному перемешиванию, после чего центрифугируют при 6000 об/мин в течение 10 минут. Осадок отбрасывают, надосадочная жидкость используется для фракционирования и определения содержания белка по Лоури с предварительным 5-, 10-, 20-кратным разведением.

Нанесение образца на колонку с сефадексом и фракционирование

На колонку с сефадексом G-50 наносят 5 см³ надосадочной жидкости, причем нанесение проводят на слой геля. Элюцию проводят 0,9%-ным раствором NaCl. Элюат собирают фракциями по 4 см³ в мерные пробирки. Собранные фракции исследуют: а) на содержание белка, б) активность амилаз, в) качественное определение восстанавливающих сахаров.

А. Содержание белка определяют в каждой фракции по методу Лоури. Данные записывают в табл. 1.5.

Таблица 1.5
Содержание белка в различных фракциях

№ фракции	Оптическая плотность A_{630}	Содержание белка, мг/см ³
1		
2		
3		
и т. д. до $V_{\text{общ}}$		

Б. Активность амилаз определяют в первых десяти фракциях (начиная от V_0) по следующей методике.

Методика проведения анализа. В пробирку вносят 5 см³ раствора крахмала (2 мг/см³), 4 см³ дистиллированной воды и 1 см³ фермента. Содержимое пробирок быстро перемешивают и отбирают пробу 2 см³ через 10 минут после внесения фермента. Пробу переносят в пробирку с 2 см³ раствора йода, приготовленного на 0,1 н. HCl. Интенсивность окраски измеряют на ФЭКе при красном светофильтре (630 нм).

Построение калибровочной кривой. Для расчета активности амилаз строят калибровочную кривую. Для этого готовят серию разведений исходного раствора крахмала (2 мг/см^3):

Раствор	Содержание крахмала, мг/см^3
1. Исходный раствор крахмала	2,0
2. $2,0 \text{ см}^3$ исходного крахмала + $2,0 \text{ см}^3$ воды	1,0
3. $1,0 \text{ см}^3$ исходного крахмала + $3,0 \text{ см}^3$ воды	0,5
4. $1,0 \text{ см}^3$ исходного крахмала + $4,0 \text{ см}^3$ воды	0,4
5. $1,0 \text{ см}^3$ исходного крахмала + $9,0 \text{ см}^3$ воды	0,2
6. $0,5 \text{ см}^3$ исходного крахмала + $9,5 \text{ см}^3$ воды	0,1

Из каждой пробирки серии разведений отбирают по 2 см^3 раствора крахмала, добавляют 2 см^3 раствора йода на $0,1 \text{ н. НСІ}$ и колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре (630 нм). Полученные данные заносят в таблицу (табл. 1.6) и строят калибровочный график в координатах: «оптическая плотность — концентрация крахмала, мг/см^3 ».

В. Определение восстанавливающих сахаров проводят в оставшихся фракциях. В пронумерованные пробирки вносят из бюретки по 1 см^3 раствора Фелинга (запрещается пользоваться пипеткой!) и содержимое оставшихся фракций (4 см^3). Помещают их в кипящую водяную баню. Через $5...10$ мин пробирки вынимают и качественно определяют содержание восстанавливающих сахаров по образованию красного осадка Cu_2O и обесцвечиванию реактива Фелинга. Все данные вносят в сводную таблицу (табл. 1.7).

Таблица 1.6
Данные для построения калибровочного графика

Крахмал, мг/см^3	Оптическая плотность, A_{630}
0,1	
0,2	
0,4	
0,5	
1,0	
2,0	

Таблица 1.7
Данные для построения графика фракционирования веществ

№ фракции	Объем элюата, см^3	Белок		Амилазы			Восстанавливающие сахара
		A_{630}	мг/см^3	A_{630}	X , мг крахмала	$(C - X)$, мг крахмала	
1							
2							
3							
и т. д. до $V_{\text{общ}}$							

Примечание. X — остаточная концентрация крахмала; C — исходная концентрация крахмала с учетом разведения; $(C - X)$ — количество прогидролизованного крахмала; $УА$ — удельная активность амилаз.

По полученным данным строят график фракционирования веществ. По оси ординат откладывают: а) содержание белка в мг/см³, б) активность амилаз в мг прогидролизованного крахмала, в) концентрацию восстанавливающих сахаров в условных единицах, а по оси абсцисс — объем элюата в см³.

Примечание. Рекомендуется данные по содержанию белка во фракциях представить на графике в виде кривой элюции белка, а распределение амилаз и восстанавливающих сахаров по фракциям — в виде диаграмм.

Лабораторная работа 1.4.5

Автолиз белков зерна и суточного солода

При прорастании зерна происходит активация многих биологически систем, в том числе и протеолитических ферментов. Происходит высвобождение ферментов из комплекса с ингибиторами, а также наблюдается синтез ферментов *de novo*. Все это способствует быстрой деградации запасных белков семян и использованию образующихся при их протеолизе аминокислот для развития проростка. Эти сложные процессы можно наблюдать в ходе эксперимента по автолизу белков зерна и солода, а также влиянию на интенсивность автолитических процессов хлорида натрия, известного как ингибитора нейтральных протеаз пшеницы, которые играют заметную роль в хлебопечении.

Цель работы: изучение автолитических процессов зерна пшеницы и пшеничного солода.

Реактивы и материалы:

- ♦ Испытуемый материал: пшеница и пшеничный солод.
- ♦ 1,5 %-ный раствор NaCl.
- ♦ Реактивы для определения белка по методу Лоури.

Методика проведения анализа. Испытуемый материал размалывают на лабораторной мельничке.

3 г размолотого зерна (солода) обрабатывают 100 см³ экстрагента (H₂O или 1,5 % NaCl). Автолиз водной или солевой вытяжки из зерна и суточного солода ведут в течение двух часов при комнатной температуре и периодическом перемешивании.

Отбор проб проводят через 0, 30, 60, 90 и 120 минут в количестве примерно 10 см³. Отобранную пробу сразу же переносят на фильтр. В фильтрате определяют содержание белка в двух повторностях.

Полученные данные заносят в сводную таблицу (табл. 1.8).

По полученным данным строят графики, демонстрирующие нарастание растворимого белка с течением времени для водной вытяжки и подав-

Данные для построения графиков

Время, мин	Образец — зерно пшеницы				Образец — пшеничный солод			
	H ₂ O		NaCl		H ₂ O		NaCl	
	A ₆₃₀	Белок, мг/см ³	A ₆₃₀	Белок, мг/см ³	A ₆₃₀	Белок, мг/см ³	A ₆₃₀	Белок, мг/см ³
0								
30								
60								
90								
120								

ление, снижение скорости автолитических процессов в присутствии NaCl для солевой вытяжки (в координатах: «белок, мг/см³ — время, мин»).

Кроме этого, делают вывод о скорости автолитических процессов для различных объектов — зерна пшеницы и пшеничного солода.

Контрольные вопросы

1. Каким образом устанавливается присутствие белков в пищевых объектах?
2. Перечислите основные этапы выделения белков из пищевых объектов. Дайте их краткую характеристику.
3. Какие способы осаждения белков применяют, если нужно сохранить нативную структуру белка?
4. Каким способом можно изучить автолитические процессы, протекающие в зерне при прорастании?
5. Назовите известные вам количественные методы определения белка.
6. Сформулируйте принцип метода определения белка по Лоури?
7. Какие методы используются для очистки белков? Какие существуют критерии однородности белковых препаратов?
8. На чем основано разделение белков методом гель-хроматографии?
9. Назовите способы нанесения образцов на колонку с сефадексом.
10. Как определить свободный и внутренний объем колонки при разделении белков методом гель-хроматографии?

Т Е М А 2

УГЛЕВОДЫ

Углеводы относятся к классу основных пищевых веществ (макронутриентов) и являются важнейшим источником энергии для организма человека. Однако роль углеводов в питании не ограничивается их значением только как источника энергии, поскольку они выполняют и ряд других важных функций: углеводы и их производные входят в состав разнообразных соединительных тканей и жидкостей организма, тонизируют центральную нервную систему, регулируют накопление кетоновых тел при окислении жиров, способствуют выведению токсичных элементов из организма человека, стимулируют моторную функцию желудочно-кишечного тракта и выполняют некоторые специализированные функции (например, предотвращают свертывание крови).

С точки зрения пищевой ценности углеводы подразделяются на усваиваемые и неусваиваемые. К усваиваемым относятся моно-, ди- и олигосахариды, крахмал, гликоген. К неусваиваемым — целлюлоза, гемицеллюлоза, инулин, пектин, гумми и слизи.

В пищевых продуктах углеводы выполняют ряд важных функций: сладость, гидрофильность, связывание ароматических веществ, обеспечение текстуры и качества пищевых продуктов. Углеводы могут вступать в разные химические реакции: гидролиз, дегидратация, карамелизация, меланоидинообразование, брожение и др., в результате чего изменяется состав углеводов, их структура и содержание.

Определение количественного содержания углеводов в пищевых продуктах проводят химическими методами (титриметрические и гравиметрические), электрохимическими, спектральными хроматографическими. В основе этих методов лежат такие свойства некоторых сахаров, как способность вращать плоскость поляризованного света и восстанавливать щелочные растворы меди (восстанавливающие и другие свойства).

Практически все пищевые продукты, являясь сложной многокомпонентной системой, перед проведением анализа требуют предварительной подготовки пробы. В общем виде схема анализа углеводов представлена на рис. 2.1.



Рис. 2.1. Схема анализа углеводов пищевого сырья и продуктов питания

2.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ

2.1.1. Определение восстанавливающих сахаров по методу Бертрана

Метод Бертрана основан на способности альдегидной группы сахаров взаимодействовать с реактивом Фелинга и восстанавливать двухвалентную медь (окись меди) до одновалентной (закись меди), выпадающей в виде осадка красного цвета.

Взаимодействие восстанавливающего сахара с реактивом Фелинга не является стехиометрической реакцией. Поэтому при пересчете меди на сахар пользуются эмпирическими таблицами, которые составлены при строго определенных условиях протекания реакции.

Реактивы и материалы:

- ♦ Реактив Фелинга (равные объемы 4 %-ного раствора CuSO_4 и щелочного раствора сегнетовой соли).

- ♦ 4 %-ный раствор CuSO_4 .

- ♦ Щелочной раствор сегнетовой соли (200 г сегнетовой соли растворяют в 500 см^3 воды, 150 г едкого натра растворяют в 300 см^3 . Раствор щелочи осторожно приливают к раствору сегнетовой соли и доводят объем до 1 дм^3).

- ♦ Раствор железоммочных квасцов (96 г квасцов растворяют в 500 см^3 воды и осторожно по стенке приливают 200 г (108 см^3) концентрированной серной кислоты. Объем доводят водой до 1 дм^3).

- ♦ 0,1 н. KMnO_4 .

Методика проведения анализа. 20 см^3 испытуемого раствора помещают в коническую колбу на 100 см^3 (содержание сахара в пробе не должно превышать 100 мг) и добавляют 40 см^3 реактива Фелинга (20 см^3 4 %-ного раствора CuSO_4 + 20 см^3 щелочного раствора сегнетовой соли). Содержимое колбы перемешивают и кипятят точно 3 минуты, время замечают с момента появления первых пузырьков.

Горячую жидкость из колбы сливают на фильтрующий слой через воронку Бюхнера в колбу Бунзена при слабом отсасывании, стараясь осадок закиси меди не переносить на фильтр. Затем осадок в колбе промывают теплой водой и перерастворяют с помощью железоммочных квасцов ($10...15 \text{ см}^3$). Далее воронку Бюхнера с фильтрующим слоем переносят в чистую колбу Бунзена и содержимое колбы небольшими порциями сливают на фильтр. Осадок на фильтре размешивают стеклянной палочкой до полного растворения. Осадок на фильтре не должен находиться на воздухе во избежание его окисления. Колбу и фильтр промывают теплой дистиллированной водой два раза.

Фильтрат сразу титруют 0,1 н. раствором перманганата калия до появления розовой окраски (от последней капли). Титр перманганата калия устанавливают по меди, что дает возможность сразу пересчитать количество пошедшего на титрование перманганата калия на эквивалентное количество меди (1 см^3 0,1 н. KMnO_4 соответствует 6,36 мг меди). Количество сахара, соответствующее данному количеству меди, находят по эмпирическим таблицам (прил. 8, с. 298).

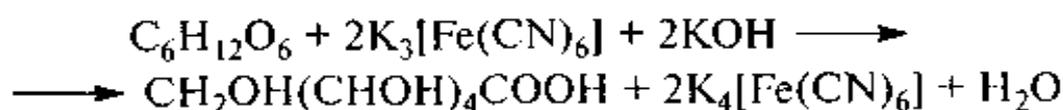
Количество сахара в процентах вычисляют по формуле:

$$x = \frac{av \cdot 100}{v_1 m},$$

где a — количество сахара в пробе (объем v_1); v — объем вытяжки, полученный из навески; v_1 — проба вытяжки (в см^3), взятая на определение; m — масса навески материала, мг.

2.1.2. Определение восстанавливающих сахаров колориметрическим методом (по И. С. Лурье)

Метод основан на взаимодействии восстанавливающих сахаров при нагревании со стандартным щелочным раствором феррицианида (красной кровяной соли). При этом часть феррицианида восстанавливается в ферроцианид (желтую кровяную соль).



Избыток феррицианида определяют на фотоэлектроколориметре по характерному поглощению в области 420...440 нм (синий светофильтр).

Расчет восстанавливающих сахаров ведут по калибровочной кривой.

Метод удобен для серийных анализов и применим в тех случаях, когда испытуемый раствор не содержит других веществ, взаимодействующих с феррицианидом, а также веществ, имеющих поглощение в данной области спектра.

При работе с биологическим материалом, исследуемые вытяжки бывают очень сложны по своему составу, часто опалесцируют, поэтому требуется определенная подготовка образца.

Метод очень удобен для изучения накопления восстанавливающих сахаров под действием ферментов, гидролизующих углеводы, в экспериментах, моделирующих технологический процесс. В этом случае исследователя интересует не абсолютное содержание восстанавливающих сахаров, а их увеличение за счет ферментативной реакции. При этом факторы, влияющие на величину оптической плотности, нивелируются контрольными или нулевыми замерами.

Реактивы и материалы:

- ♦ 1 %-ный раствор феррицианида (10 г в 1 дм^3).
- ♦ 1,25 н. раствор KOH (70 г в 1 дм^3).
- ♦ 1 %-ный исходный раствор глюкозы.
- ♦ 0,1 %-ный и 0,2 %-ный рабочие растворы.

Методика проведения анализа. В коническую колбу на 100 см^3 вносят 10 см^3 раствора феррицианида, 5 см^3 раствора щелочи и от 1 до 5 см^3 испытуемого раствора. Если объем пробы меньше 5 см^3 , то недостающее количество компенсируют водой. Колбочку прикрывают ча-

совым стеклом и на слабом огне доводят до кипения. Кипятят ровно 1 минуту. Затем содержимое колбочки охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность на ФЭКе при синем светофильтре (420 нм). Количество сахара в испытуемом растворе определяют по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой

Концентрацию исходного раствора глюкозы устанавливают по методу Бертрана (см. п. 2.1.1). Для этого берут три пробы по 5 см³ 1 %-ного раствора глюкозы, добавляют к каждой пробе по 15 см³ воды и 40 см³ реактива Фелинга. Концентрацию исходного раствора глюкозы рассчитывают как среднее значение из трех параллельных определений. Точную концентрацию рабочих растворов глюкозы рассчитывают по данным анализа исходного раствора.

Сухие конические колбочки на 100 см³ заполняют согласно табл. 2.1.

Таблица 2.1

Данные для построения калибровочной кривой

Номер колбы	K ₂ [Fe(CN) ₆], см ³	KOH, см ³	Глюкоза, см ³		Вода, см ³
			0,1 %	0,2 %	
1	10	5	—	—	5,0
2	10	5	0,5	—	4,5
3	10	5	1,0	—	4,0
4	10	5	1,5	—	3,5
5	10	5	2,0	—	3,0
6	10	5	2,5	—	2,5
7	10	5	3,0	—	2,0
8	10	5	3,5	0,5	1,5
9	10	5	4,0	1,0	1,0
10	10	5	4,5	1,5	0,5
11	10	5	5,0	2,0	—
12	10	5	—	2,5	4,5
13	10	5	—	3,0	4,0
14	10	5	—	3,5	3,5
15	10	5	—	4,0	3,0
16	10	5	—	4,5	2,5
17	10	5	—	5,0	2,0

Таблица 2.1 (продолжение)

Данные для построения калибровочной кривой

Номер колбы	$K_2[Fe(CN)_6]$, см ³	KOH, см ³	Глюкоза, см ³		Вода, см ³
			0,1 %	0,2 %	
18	10	5	—	—	1,5
19	10	5	—	—	1,0
20	10	5	—	—	0,5
21	10	5	—	—	—

В заполненных колбочках проводят определение содержания глюкозы колориметрическим методом и строят калибровочную кривую в координатах «оптическая плотность — количество глюкозы, мг».

2.1.3. Определение восстанавливающих сахаров методом Шомадьи — Нельсона

Колориметрический метод Шомадьи — Нельсона основан на реакции восстанавливающих сахаров с реактивом Шомадьи — Нельсона, в результате которой образуется окрашенное соединение голубого цвета. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию восстанавливающих углеводов, которые определяют по величинам оптических плотностей при 508 нм, по калибровочной кривой, составленной с применением модельных растворов.

Реактивы и материалы:

- ♦ Реактив Шомадьи (приготовление см. в прил. 5, с. 294).
- ♦ Реактив Нельсона (приготовление см. в прил. 5).

Методика проведения анализа. К 1 см³ испытуемого раствора добавляют 1 см³ реактива Шомадьи, перемешивают и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Затем к охлажденной смеси добавляют 1 см³ реактива Нельсона и доводят объем до 10 см³ дистиллированной водой.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют при 590 нм с использованием кюветы с шириной грани 5 мм.

Построение калибровочной кривой. Калибровочную кривую строят после проведения колориметрической реакции модельных растворов глюкозы с концентрацией от 0,02 до 0,14 мг/см³. Изучаемая зависимость выражается прямой линией, выходящей из начала координат.

2.1.4. Определение фруктозы и других кетосахаров (по Мак-Рери и Слаттери)

Метод Мак-Рери и Слаттери основан на способности кетосахаров давать окраску с резорцином в кислой среде.

Реактивы и материалы:

- ♦ Спиртовой раствор резорцина (1 г резорцина в 1 дм³ 95 %-ного этанола).
- ♦ 30 %-ный раствор HCl (не должен давать окраску с резорцином).
- ♦ Стандартный раствор фруктозы (100 мг фруктозы в 100 см³ насыщенного водяного раствора бензойной кислоты); рабочий раствор фруктозы (1 см³ стандартного раствора фруктозы разводят в мерной колбе на 100 см³).

Инулин для приготовления стандартного раствора не используется, так как даваемая им окраска зависит от источника и методов его выделения.

Методика проведения анализа. В пробирку вносят 5 см³ испытуемого раствора (содержащего от 1 до 8 мг фруктозы в 100 см³ раствора), 5 см³ спиртового раствора резорцина и 15 см³ 30 %-ного раствора HCl. Содержимое пробирки перемешивают и помещают на 20 минут в водяную баню при температуре 80 °С. Затем содержимое пробирки охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность на ФЭКе при 540 нм (зеленый светофильтр).

В качестве контроля используют раствор, в котором вместо 5 см³ испытуемого раствора берется 5 см³ H₂O.

Количество фруктозы определяют по калибровочной кривой. Для этого готовят серию разведений рабочего раствора фруктозы, в каждом из которых проводят определение фруктозы по описанной выше методике. Калибровочную кривую строят в координатах: «оптическая плотность — количество фруктозы, мг».

2.1.5. Газохроматографическое определение отдельных сахаров

Метод основан на переводе углеводов типа глюкозы, фруктозы, арабинозы, ксилозы, галактозы, сахарозы, мальтозы, лактозы, раффинозы, а также полиолов — сорбита и инозита в пищевых продуктах в триметилсилильные производные с последующей их идентификацией на газовом хроматографе.

Аппаратура, реактивы и материалы:

- ♦ Газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором и устройством для программирования температуры.
- ♦ Стеклянная насадочная колонка длиной 2...3 м и диаметром 3...4 мм или капиллярная колонка длиной 25...30 м с нанесенной фазой.
- ♦ Микрошприц емкостью 1,0...10 мкл.
- ♦ Роторный испаритель.
- ♦ Гексан, х.ч.
- ♦ Гексаметилдисилазан.
- ♦ Трифторуксусная кислота или триметилхлорсилан.
- ♦ Пиридин, х.ч., безводный.
- ♦ Ксилит, х.ч. или инозит.
- ♦ Свинец уксуснокислый, х.ч.
- ♦ Неподвижные фазы для ГЖХ SE-30, OV-17, XE-60, СКТФТ-50.
- ♦ Инертный носитель для ГЖХ: хромосорб-W DMCS, хроматон-N DMCS.

Методика проведения анализа.

1. Подготовка образцов к анализу.

Для получения достоверных результатов анализа необходимо учитывать содержание жира и лимонной кислоты в испытуемом образце. Предварительно содержание этих компонентов в пищевых продуктах можно оценить по «Таблицам химического состава пищевых продуктов» и на основании этого выбрать один из следующих способов подготовки образца к анализу.

1.1. Продукты с низким содержанием жира (менее 1,5%). Продукты с низким содержанием лимонной кислоты (менее 1,5%). Содержание лимонной кислоты устанавливается по «Таблицам химического состава». К ним относятся соки, вина, пиво, фруктово-ягодные кондитерские изделия, мед, сиропы и др.

Навеску гомогенизированной пробы продукта с высоким содержанием сухих веществ (более 60%) наносят на полиэтиленовую пластинку в количестве 50...150 мг и взвешивают на аналитических весах с точностью 0,0001 г. На этой же пластинке взвешивают 5...10 мг ксилита. Пластинку помещают в круглодонную колбу емкостью 10...25 см³ и силилируют без обезвоживания с использованием трифторуксусной кислоты. При использовании триметилхлорсилана содержимое колбы упаривают досуха на роторном испарителе при 60 °С под вакуумом. В случае медленного упаривания в колбу добавляют 1 см³ бензола. После упаривания проводят силилирование.

Жидкие продукты отмеряют пипеткой в количестве $0,5...1,0\text{ см}^3$ и помещают в круглодонную колбу емкостью $10...25\text{ см}^3$, снабженную шлифом. Туда же на полиэтиленовой пластинке вносят навеску $5...10\text{ мг}$ ксилита, взвешенного с точностью $0,0001\text{ г}$. Содержимое колбы упаривают досуха на роторном испарителе.

Продукты с содержанием лимонной кислоты более $1,5\%$. Для исключения наложения пика ТМС-производного лимонной кислоты на ТМС-производное β -глюкозы, лимонную кислоту осаждают уксуснокислым свинцом. Навеску средней гомогенизированной пробы продукта (свежие цитрусовые плоды, цитрусовые соки, продукты, содержащие лимонную кислоту как пищевую или консервирующую добавку) в количестве $1...1,5\text{ г}$ взвешивают с точностью до $0,0001\text{ г}$ в конической колбе емкостью 100 см^3 , приливают 30 см^3 $75...80\%$ -ного раствора этанола и экстрагируют 30 минут при температуре $60...70^\circ\text{C}$. Используют водяную баню и обратный холодильник. Экстракцию повторяют трижды, экстракты объединяют.

Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой. В центрифужную пробирку на 10 см^3 вносят пипеткой 5 см^3 отфильтрованного экстракта, $0,5\text{ см}^3$ насыщенного раствора уксуснокислого свинца. Осадок центрифугируют. 1 см^3 надосадочной жидкости переносят в круглодонную колбу со шлифом емкостью $10...25\text{ см}^3$. Туда же на полиэтиленовой пластинке вносят навеску ксилита $5...10\text{ мг}$.

Содержимое колбы упаривают на роторном испарителе при 60°C под вакуумом.

1.2. Продукты с высоким содержанием жира (более $1,5\%$). Продукты с содержанием лимонной кислоты менее $1,5\%$ (детское молочное питание, сухие молочные смеси и др.). Навеску средней гомогенизированной пробы продукта с высоким содержанием сухих веществ (более 60%) в количестве $500...1000\text{ мг}$ помещают в центрифужную пробирку. Туда же на полиэтиленовой пластинке вносят с точностью до $0,0001\text{ г}$ навеску ксилита $2...5\text{ мг}$. Проводят экстракцию с 2 см^3 гексана с последующим центрифугированием. Экстракцию проводят трижды, декантируя гексановый слой. Остатки гексана высушиваются в токе азота, после чего проводят силилирование.

Пробу стуженного молока взвешивают в центрифужной пробирке и проводят обезжиривание, как описано выше, затем добавляют 20 см^3 50% -ного водного раствора этанола, тщательно перемешивают, затем обрабатывают аналогично жидким молочным продуктам.

10 см^3 жидких молочных продуктов помещают в центрифужную пробирку, смешивают с 10 см^3 96% -ного этанола, выдерживают $30...40$

минут и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 минут. 1 см³ надосадочной жидкости помещают в круглодонную колбу, туда же на полиэтиленовой пластинке вносят 2...5 мг ксилита, содержимое упаривают насухо на роторном испарителе при 60 °С, после чего проводят силилирование.

Продукты с содержанием лимонной кислоты более 1,5 % и хлебобулочные изделия. Навеску средней гомогенизированной пробы продукта в количестве 10...15 г, взвешенную с точностью до 0,0001 г, помещают в центрифужную пробирку и подвергают трижды экстракции 30 см³ гексана, объединяя гексановый слой декантированием. Осадок шпателем переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³, тщательно смывая остатки со шпателя и пробирки 75 %-ным раствором этанола. Затем трижды экстрагируют содержимое колбы 75 %-ным раствором этанола, подогревая колбу на водяной бане при 60 °С. Отфильтрованные экстракты объединяют и доводят дистиллированной водой до метки в мерной колбе на 100 см³. В мерную пробирку на 10 см³ вносят 5 см³ экстракта и 0,5 см³ насыщенного раствора уксуснокислого свинца. После выпадения осадка надосадочную жидкость в количестве 1,0 см³ переносят в круглодонную колбу вместимостью 10...25 см³. Туда же вносят на полиэтиленовой пластинке 2...5 мг ксилита (с точностью до 0,0001 г) и содержимое колбы упаривают на роторном испарителе при 60 °С под вакуумом, после чего проводят силилирование.

2. Силилирование сахаров.

2.1. Способ с использованием трифторуксусной кислоты. В подготовленную навеску образца приливают 1,0 см³ пиридина, 0,9 см³ гексаметилдисилазана, 0,1 см³ трифторуксусной кислоты, плотно закрывают и энергично встряхивают в течение 30 секунд. Вначале наблюдают расслоение жидкости на 2 фазы, при этом нижний слой незначителен. По мере стояния раствора в течение 20...30 минут это расслоение исчезает и начинает выделяться аммиак, что указывает на успешное протекание реакции силилирования. После прекращения выделения аммиака раствор выдерживают 12 часов при комнатной температуре или 1 час при 60 °С. Длительно сохраняющееся расслоение, исчезающее только при нагревании, говорит о том, что реакция силилирования прошла не полностью из-за высокого содержания влаги (более 40 %) или повышенного содержания углеводов. В этом случае подготовку пробы повторяют, уменьшив при этом навеску или увеличив время высушивания на роторном испарителе.

2.2. Способ с использованием триметилхлорсилана. В подготовленную навеску образца приливают точно $1,0 \text{ см}^3$ пиридина, $0,2 \text{ см}^3$ гексаметилдисилазана и $0,1 \text{ см}^3$ триметилхлорсилана, встряхивают в течение 1 минуты и нагревают в термостате 45 минут при 60°C , затем хроматографируют.

Для упрощения идентификации и количественных расчетов (если не требуется знания аномерного состава сахаров) определение сахаров производят в виде ТМС-производных сахаров. В подготовленную пробу образца добавляют 100 г гидроксилamina солянокислого, приливают 10 см^3 пиридина и выдерживают в термостате при 80°C в течение 2 часов. Охлаждают и далее приливают силилирующие агенты.

3. Газохроматографический анализ.

3.1. Подготовка хроматографической колонки. Стеклянную колонку, заполненную готовым сорбентом (количество неподвижной фазы 3...5% от массы носителя) длиной 2 м и внутренним диаметром 3 мм устанавливают в термостате хроматографа и проводят термокондиционирование при продувании потоком газа-носителя (гелий, азот, водород) 2 ч при 100°C , 2 ч при 150°C , 4 ч при 200°C и 8 ч при 250°C . Затем устанавливают рабочий режим: температуру колонки программируют от 125 до 270°C со скоростью 4°C в 1 мин, температуру испарителя 250°C , расход газа-носителя $40 \text{ см}^3/\text{мин}$, температура пламенно-ионизационного детектора 250°C , продолжают кондиционировать в течение рабочего дня.

3.2. Газохроматографическое определение. 1 мкл пиридинового раствора триметилсилильных производных углеводов вводят в испаритель и элюируют из колонки газом-носителем. Идентификацию индивидуальных триметилсилильных производных проводят по времени удерживания триметилсилильных производных сахаров-метчиков и методом добавок.

3.3. Приготовление стандартных растворов сахаров. Сахара, имеющие α - и β -аномеры. Навеску ксилита и навеску определяемого сахара, взятую с точностью $0,0001 \text{ г}$, помещают в коническую колбу и заливают дистиллированной водой до полного растворения углеводов. Раствор выдерживают в течение суток. Аликвотную часть раствора отбирают пипеткой, помещают в круглодонную колбу и упаривают досуха, после чего проводят силилирование.

Сахара, не имеющие аномеров. Сахара, не имеющие аномеров, силилируются без предварительного растворения.

4. Расчеты.

Массовую долю отдельных сахаров (в %) в навеске продукта определяют по формуле:

$$C_1 = \frac{A_1 K_1 C \cdot 100}{A_c m},$$

где C_1 — содержание отдельного сахара в навеске, %; K_1 — поправочный коэффициент данного сахара; C — масса навески стандарта, мг; m — масса навески образца; A_c — площадь пика стандарта в относительных единицах; A_1 — площадь пика данного сахара в относительных единицах.

В виду того, что α -лактоза и сахароза выходят на хроматограмме одним пиком, площадь пика α -лактозы определяют, исходя из соотношения площадей α - и β -лактозы в модельном соединении лактозы, приготовленной по п. 3.3. За основу берется площадь пика β -лактозы. Площадь пика сахарозы определяют вычитанием от суммарного пика сахарозы пика α -лактозы, рассчитанного по п. 4, из пика β -лактозы.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений. Окончательный результат округляют до трехзначной цифры.

2.1.6. Определение декстринов по методу М. П. Попова и Е. Ф. Шаненко

Метод применяется для определения декстринов в объектах крупяной, комбикормовой, мукомольной и хлебопекарной промышленности и основан на образовании окрашенных комплексов с йодом.

Реактивы и материалы:

- ♦ основной раствор йода;
- ♦ рабочий раствор йода — 0,005 н.

Методика проведения анализа. 10...15 г зерна измельчают на лабораторной мельнице, 2 г продукта (проход через сито 1 мм) взвешивают с погрешностью до 0,01 г, количественно переносят в стакан механической мешалки, добавляют 200 см³ дистиллированной воды и экстрагируют в течение 5 минут при интенсивном перемешивании при 3000 об/мин. Смесь фильтруют. В фильтрате определяют содержание декстринов. Для этого в химический стакан вместимостью 50 см³ отбирают 5 см³ фильтрата, добавляют 5 см³ 0,005 н. раствора йода и определяют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при длинах волн 660 и 530 нм.

Содержание декстринов C_D и амилозы C_A в растворе вычисляют по эмпирическим формулам:

$$C_A = 0,044D_{660} - 0,123D_{530}; C_D = 2D_{660} - 47,7C_A;$$

где C_A — концентрация амилозы в растворе, мг/см³; D_{660} и D_{530} — оптические плотности раствора при длине волны 660 и 530 нм.

Пересчет на сухие вещества (в %) проводят по следующим формулам:

$$A = \frac{2 \cdot 10^6 \cdot C_A}{100 - W}, D = \frac{2 \cdot 10^6 \cdot C_D}{100 - W},$$

где A — массовая доля амилозы в пересчете на сухие вещества, %; D — массовая доля декстринов в пересчете на сухие вещества, %; W — массовая доля влаги в продукте, %.

2.1.7. Поляриметрическое определение содержания крахмала (по Эверсу)

Крахмал — растительный компонент со сложным строением. Он состоит из амилозы и амилопектина; их соотношение различно в различных источниках крахмала (амилозы 13...30%; амилопектина 70...85%).

Крахмал является важным компонентом пищевых продуктов, исполняя роль загустителя и связующего агента. В одних случаях он может содержаться в сырье, которое перерабатывается в пищевые продукты, в других случаях крахмал добавляют к продукту для придания тех или иных свойств (производство супов, пудингов, начинок и др.).

Метод определения крахмала основан на гидролизе крахмала раствором соляной кислоты и количественном определении крахмала поляриметрическим методом.

Метод используется для определения крахмала в зерне, муке, продуктах помола (отруби), хлебобулочных изделиях, картофеле и других крахмалосодержащих продуктах с массовой долей крахмала выше 10 %.

Аппаратура, реактивы и материалы:

- ♦ Поляриметр или сахариметр.
- ♦ Соляная кислота, раствор массовой концентрацией 1,24 г/дм³, для анализа картофеля — 3,77 г/дм³.
- ♦ Калий железистосинеродистый, раствор массовой концентрацией 150 г/дм³.
- ♦ Цинка сульфат, раствор массовой концентрацией 150 г/дм³.

- ♦ Аммония молибдат, раствор массовой концентрацией 100 г/дм³.
- ♦ Натрия молибдат, раствор массовой концентрацией 150 г/дм³.
- ♦ Фосфорно-вольфрамовая кислота, раствор массовой концентрацией 40 г/дм³.

Подготовка проб для анализа.

1. Пробы, влажность которых превышает 17 %, предварительно подсушивают на воздухе или в одном из следующих устройств: сушильном шкафу, термостате, лабораторном сушильном аппарате при температуре не более 50 °С. Пробу тщательно перемешивают, измельчают до такой степени, чтобы весь размолотый материал прошел при просеивании через сито из проволочной сетки № 8.

2. Одновременно с взятием навесок для анализа берут навески для определения влажности. Определение влажности осуществляется по ГОСТам, принятым в соответствующей отрасли.

Методика проведения анализа.

1. Берут навеску исследуемого объекта массой 5 г с погрешностью не более 0,01 г, помещают в 100 см³ 10 %-ного раствора этанола (при определении массовой доли крахмала в отрубях — 28 см³ раствора этанола) и перемешивают стеклянной палочкой. Стеклянную палочку ополаскивают 2 см³ раствора этанола. Закрывают центрифужный стакан резиновой пробкой и вручную сильно встряхивают в течение 2 минут.

После встряхивания стенки центрифужного стакана и резиновую пробку ополаскивают 25 см³ этанола (при определении массовой доли крахмала в отрубях — 15 см³). Затем в течение 20 минут пробу центрифугируют при 4000 об/мин, после чего прозрачный центрифугат сливают. К остатку постепенно добавляют 20 см³ соляной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой до образования суспензии и переносят в мерную колбу на 100 см³. Прилипшие к стенкам центрифужного стакана и к стеклянной палочке остатки пробы многократно ополаскивают раствором соляной кислоты массовой концентрацией 1,24 г/дм³ в мерную колбу; общее количество раствора соляной кислоты 50 см³.

2. Мерную колбу при постоянном встряхивании погружают в кипящую водяную баню. Из-за погружения мерной колбы не должен нарушаться процесс кипения водяной бани: с помощью специальных уплотнительных колец ее следует держать по возможности закрытой. По секундомеру встряхивают мерную колбу в течение 3 минут, при этом колбу из водяной бани не поднимают. После этого выдерживают колбу без встряхивания для всех крахмалосодержащих продуктов,

кроме картофеля, 12 минут (при определении массовой доли крахмала в картофеле — 27 минут) по секундомеру.

По истечении в общей сложности 15 минут для всех крахмалосодержащих продуктов, кроме картофеля, (для картофеля — 30 минут), колбу вынимают из бани и быстро приливают столько холодной воды, чтобы до мерной черты оставался объем не более 10...15 см³. Содержимое колбы охлаждают в проточной воде до температуры 20 °С.

Белковые вещества в растворе осаждают добавлением 2 см³ раствора калия железистосинеродистого (150 г/дм³) и после перемешивания 2 см³ раствора цинка сульфата (150 г/дм³). Затем мерную колбу в течение 10...15 минут выдерживают при комнатной температуре, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и в течение 5 минут дают отстояться. Взамен обоих указанных реактивов в случае их отсутствия для осаждения белков и осветления раствора в колбу приливают 5 см³ раствора молибдата аммония (100 г/дм³), или 5 см³ раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (40 г/дм³), или 3 см³ раствора молибдата натрия (165 г/дм³). При использовании молибдатов в качестве осадителей белков рекомендуется избегать попадания солнечных лучей на реактивы. Содержимое колбы через сухой складчатый фильтр фильтруют в сухую коническую колбу, первые несколько капель фильтрата отбрасывают. Прозрачным фильтратом заполняют трубку поляриметра и в поляриметре измеряют оптическое вращение. Угол вращения плоскости поляризованного света измеряют 5 раз.

До начала и после каждого второго измерения производят контроль установки поляриметра на нуль. Средняя величина 5 измерений служит исходной величиной для дальнейших вычислений массовой доли крахмала.

Массовую долю крахмала X в процентах вычисляют по следующим формулам:

- ♦ при использовании сахариметра с нормальной шкалой:

$$X = K \cdot a,$$

- ♦ при использовании сахариметра с круговой шкалой:

$$X = \frac{K \cdot a}{0,3468},$$

где K — переводной коэффициент, который при длине трубки 2 дм равен: для пшеницы — 1,898; кукурузы — 1,879; ржи — 1,885; ячменя — 1,912; риса — 1,866; проса — 1,818; гречихи — 1,805; картофеля — 1,855; вики, гороха, чечевицы — 1,747; овса — 1,914; a — показатель сахариметра или поляриметра в градусах шкалы (переводные коэффициенты K для трубки 1 дм умножают на 2).

2.1.8. Определение крахмала йодометрическим методом (по Х. Н. Починку)

Метод основан на получении комплексного соединения крахмала с йодом, последующем окислении крахмала бихроматом калия и йодометрическом определении избытка последнего.

Реактивы и материалы:

- ♦ 0,5 н. раствор бихромата калия (49 г бихромата калия в колбе вместимостью 2 дм³ растворяют в 250 см³ дистиллированной воды, постепенно при охлаждении прибавляют 800 см³ серной кислоты (плотность — 1,84 г/см³), после перемешивания и охлаждения доводят до метки дистиллированной водой и переливают в склянку с притертой пробкой).

- ♦ 80 %-ный раствор азотнокислого кальция (200 г азотнокислого кальция $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 70 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 250 см³).

- ♦ 0,5 %-ный раствор йода в растворе KI.

- ♦ 0,1000 н. раствор тиосульфата (готовят из фиксаля в день проведения анализа).

- ♦ Индикатор — 0,5 %-ный раствор растворимого картофельного крахмала.

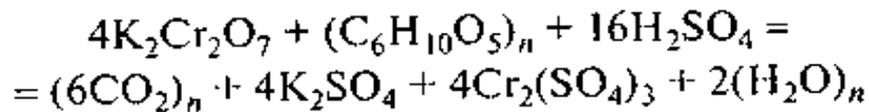
Методика проведения анализа.

1. Подготовка пробы для анализа. Для количественного определения крахмала берут навеску 0,25...3,00 г крахмалосодержащего объекта исследования (определяемое содержание крахмала в навеске от 20 до 200 мг крахмала), растирают в ступке с 5 см³ 80 %-ного раствора азотнокислого кальция, переносят в коническую колбу вместимостью 200 см³, смывают 25 см³ 80 %-ного раствора азотнокислого кальция, колбу накрывают стеклянной воронкой, ставят на плитку и кипятят (несильно) в течение 3 минут. При этом крахмал переходит в раствор. После охлаждения воронку ополаскивают водой. Содержимое колбы переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр.

2. Осаждение крахмала. 5 см³ фильтрата (при малом содержании крахмала в объекте исследования — 10 см³ фильтрата) переносят в центрифужную пробирку, прибавляют 2 см³ 0,5 %-ного раствора йода, перемешивают стеклянной палочкой, ополаскивают ее 5...6 каплями воды и оставляют на 30 минут. При этом осаждается соединение крахмала с йодом, содержащее 14...16 % йода. Затем центри-

фугируют и прозрачный раствор сливают возможно полнее, осадок промывают 5 %-ным раствором азотнокислого кальция несколько раз, каждый раз прибавляя 5 см³, и перемешивают осадок с раствором стеклянной палочкой, которую затем промывают тем же раствором. Промывание повторяют 3...6 раз в зависимости от количества примесей.

3. Окисление крахмала. Промытый осадок крахмала с йодом сливают в коническую колбу вместимостью 200 см³ небольшими порциями воды по 0,2...0,3 см³, хорошо перемешивая стеклянной палочкой. Общее количество воды не должно превышать 3 см³. В колбу прибавляют 10 см³ 0,5 н. раствора бихромата калия, приготовленного на 85 %-ной серной кислоте, перемешивают и сейчас же помещают на 15 минут на кипящую водяную баню. При этом крахмал окисляется бихроматом калия до углекислоты и воды согласно уравнению:



Затем колбу снимают, дают остыть, прибавляют 5 см³ 20 %-ного раствора йодистого калия, который, реагируя с избытком бихромата калия, выделяет йод; последний оттитровывают 0,1000 н. раствором тиосульфата. Для этого титруют тиосульфатом до светло-желтого оттенка, добавляют 1 см³ 0,5 %-ного растворимого картофельного крахмала в качестве индикатора.

1 см³ 0,1 н. раствора тиосульфата натрия соответствует 0,675 мг крахмала (йод, адсорбированный крахмалом, практически не сказывается на результатах определения).

Отдельно титруют 10 см³ 0,5 н. раствора бихромата калия после разбавления его 100 см³ воды и прибавления 5 см³ 20 %-ного раствора йодистого калия (контрольное титрование).

4. Расчет содержания крахмала (в %) в исследуемом объекте. Из полученных данных вычисляется содержание крахмала по формуле:

$$X = \frac{0,675 \cdot VT(a - a_1)}{V_1 m},$$

где V — объем исследуемого раствора, в котором растворена навеска исследуемого вещества, см³; T — титр раствора тиосульфата, мг; a — объем раствора тиосульфата, затраченного на контрольном титровании бихромата калия, см³; a_1 — объем раствора тиосульфата, затраченного на определение крахмала в исследуемом объекте, см³; V_1 — объем исследуемого раствора, взятого для осаждения крахмала, см³; m — масса навески исследуемого объекта, г.

2.1.9. Антроновый метод определения сахаров и крахмала

Антроновый реактив образует синевато-зеленоватое окрашивание со всеми растворимыми углеводами, которые в одинаковой концентрации дают окрашенные растворы практически одной и той же оптической плотности. Это позволяет при определении углеводов использовать калибровочную кривую, составленную по глюкозе, для определения других сахаров. Метод дает возможность определять крахмал и сахара в небольших концентрациях (до 0,2 мг в пробе).

Реактивы и материалы:

- ♦ Антроновый реактив (0,2 %-ный раствор антрона в концентрированной серной кислоте).
- ♦ 0,5 %-ный раствор H_2SO_4 (2,8 см³ серной кислоты, плотностью 1,84 растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды).
- ♦ 30 %-ный раствор сернокислого цинка.
- ♦ 15 %-ный раствор желтой кровяной соли — $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$.

Методика проведения анализа. 1 г измельченного материала (корнеплодов, плодов и др.) помещают в 2 мерные колбы на 100 см³. В одну колбу для суммарного определения сахаров и крахмала прибавляют 50 см³ 0,5 %-ной серной кислоты и гидролизуют крахмал на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Затем добавляют по 2 см³ 30 %-ного раствора сернокислого цинка и 15 %-ного раствора желтой кровяной соли для осветления раствора, после чего раствор доводят до метки дистиллированной водой и фильтруют. Экстракт должен содержать не более 0,2 мг/см³.

В другой колбе с навеской, предназначенной для определения растворимых сахаров, проводят извлечение в течение часа с 80 см³ воды при периодическом перемешивании. После этого экстракт осветляют, прибавляя по 1 см³ растворов сернокислого цинка и желтой кровяной соли.

Берут по 2 пробирки для каждого экстракта, а также для контрольного определения и приливают по 3 см³ антронового реактива, а затем по 1 см³ опытной вытяжки из первой колбы (сумма сахаров, полученных после гидролиза) и из второй колбы (растворимые сахара). В качестве контроля используют пробирки, в которых вместо вытяжки добавляют 1 см³ воды.

Все пробирки быстро взбалтывают и помещают в кипящую водяную баню на 7 минут. После кипячения пробирки с растворами охлаждают до комнатной температуры, определяют оптическую плот-

ность при 610 нм против контрольной пробы. По калибровочной кривой рассчитывают содержание сахаров.

По экстракту в первой колбе определяют суммарное содержание сахаров и крахмала, а по экстракту второй колбы определяют содержание свободных сахаров. Расчет производят по формуле:

$$X = \frac{av \cdot 100}{m},$$

где a — количество сахаров, найденное по калибровочной кривой; v — объем экстракта (см^3); m — масса навески, взятой на определение.

2.1.10. Определение клетчатки (по Кюшнеру и Ганаку)

Клетчатка (целлюлоза) — самый распространенный в природе полисахарид. По химической структуре целлюлоза — моногликан, состоящий из линейных цепей β -D-(1,4) — глюкопиранозных единиц.

Целлюлоза является важнейшим компонентом клеточных стенок растений и в сочетании с другими соединениями обеспечивает уникальную механическую прочность этих стенок. Полимерные ассоциации целлюлозы могут иметь кристаллические и аморфные области, и именно аморфные области могут подвергаться воздействию растворителей и химических реагентов.

Метод определения целлюлозы основан на окислении, разрушении и растворении различных химических соединений, входящих в состав пищевого сырья или пищевого продукта, смесью уксусной и азотной кислот. При этом целлюлоза практически не растворяется, отфильтровывается и взвешивается.

Реактивы и материалы:

- ♦ Смесью по объему (1 : 10) азотной кислоты (плотность $1,4 \text{ г/см}^3$) и 80 %-ной уксусной кислоты.
- ♦ Этиловый эфир и этиловый спирт.
- ♦ 0,2 М спиртовой раствор щелочи.

Методика проведения анализа. Берут навеску образца 1 г на аналитических весах, помещают навеску в колбу на 100 см^3 , приливают 40 см^3 смеси кислот, закрывают колбу обратным холодильником и нагревают на песчаной бане в течение 1 часа.

Затем отфильтровывают белый, слегка кремовый осадок через стеклянный тигель № 2 или тигель Гуча с асбестовым фильтром. Если осадок после отсасывания экстракта имеет кремовый цвет, то его про-

мывают 1...2 раза горячей 0,2 М спиртовой щелочью, затем несколько раз — небольшими порциями дистиллированной воды и под конец — 10 см³ спирта с эфиром.

При этом следят, чтобы растворители хорошо отмыли стенки тиглей (при анализе масляных культур на них может остаться маслянистая жидкость). Тигли с чисто-белым осадком высушивают до постоянной массы при температуре 105 °С в сушильном шкафу.

При анализе кормовых и овощных растений навески сухого материала увеличивают до 1,5 г, заливают 50 см³ смеси кислот и также нагревают в течение 1 часа.

Для расчета содержания целлюлозы (в %) в исследуемом объекте используют следующую формулу:

$$X = \frac{(a - a_1) \cdot 100}{m},$$

где a_1 — масса сухого без осадка тигля, в г; a — масса тигля с сухим осадком, г; m — масса навески исследуемого объекта, г.

2.1.11. Определение пищевых волокон ферментативным методом

К пищевым волокнам относятся неусваиваемые сложные углеводы (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин, гумми, слизи) и лигнин. Пищевые волокна должны обязательно присутствовать в рационе питания человека, поскольку выполняют важные функции в процессе пищеварения: удерживают влагу, способствуют формированию пищевого комка и его прохождению по пищеварительному тракту, усиливают моторику желудочно-кишечного тракта, сорбируют яды и токсины, способствуя тем самым их выведению из организма.

Суточная норма потребления пищевых волокон составляет 20...25 г.

Для определения пищевых волокон существуют несколько методов. Предлагаемый метод заключается в гидролизе и удалении белковых и крахмалистых веществ ферментами, аналогичными ферментам пищеварительного тракта человека, выделенным из продуктов растительного происхождения.

Метод позволяет определять растворимые (в этиловом спирте) и нерастворимые пищевые волокна, отличающиеся физиологическим действием.

Реактивы и материалы:

- ♦ Панкреатин, медицинский препарат.
- ♦ Глюкоамилаза.
- ♦ Гемоглобин бычий окисленный лиофилизированный (300 мг гемоглобина растворяют в 12,9 см³ дистиллированной воды, приливают 2,1 см³ 0,3 М раствора соляной кислоты).
- ♦ Протеолитический ферментный препарат, например пепсин А из слизистой оболочки желудка свиньи (68,5 мг пепсина растворяют в 10 см³ раствора 0,03 М соляной кислоты).
- ♦ 3 М раствор соляной кислоты.
- ♦ 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Активность пепсина определяется следующим образом. 0,2 см³ раствора пепсина приливают к 1 см³ субстрата гемоглобина, предварительно нагретого на водяной бане в течение 5 минут при температуре 37 °С. Инкубируют смесь при той же температуре в течение 10 минут (по секундомеру). Реакцию останавливают путем добавления 5 см³ 3 М раствора соляной кислоты.

Смесь выдерживают на водяной бане еще 5 минут. Фильтруют через плотный бумажный фильтр (фильтраты должны быть прозрачными).

Одновременно с опытными готовят контрольную пробу. Для этого к 1 см³ субстрата гемоглобина приливают 0,2 см³ раствора соляной кислоты концентрацией 0,03М и 5 см³ 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты, затем инкубируют смесь и фильтруют по предложенной схеме.

Активность пепсина определяют по начальной скорости реакции спектрофотометрически: оптическую плотность опытных и контрольных фильтратов измеряют против дистиллированной воды при длине волны 280 нм в кюветах 1 см на СФ-26 или другом аналогичном приборе.

Построение градуировочного графика. Готовят серию стандартных растворов пепсина с концентрацией фермента 50, 100, 150, 200, 250 мкг/см³ (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Приготовление стандартных растворов пепсина для построения градуировочного графика

Количество раствора, см ³	Концентрация фермента, мкг/см ³				
	50	100	150	200	250
рабочего стандарта пепсина	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
соляной кислоты концентрации 0,03 М	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5

Во всех растворах, приготовленных по таблице, определяют содержание пепсина, как описано выше, и строят градуировочный график, откладывая по оси ординат величины оптических плотностей, а по оси абсцисс — концентрацию пепсина в мкг. По графику определяют количество активного пепсина в исследуемом препарате. Результаты измерений выражают в протеиназных единицах по гемоглобину ($ПЕ_{Hb}$). За протеиназную активность принимают действие такого количества фермента, которое в данных условиях опыта и измерений за 1 минуту приводит к увеличению оптической плотности фильтрата на единицу. Например, по градуировочному графику 250 мкг пепсина увеличивают оптическую плотность фильтрата на 0,5 за 10 минут, следовательно, 5000 мкг пепсина приводит к увеличению оптической плотности на единицу за 1 минуту ($1 ПЕ_{Hb} = 5000 \text{ мкг}$ или $1 \text{ мкг} = 5 \cdot 10^{-3} ПЕ_{Hb}$).

Методика проведения анализа.

1. Приготовление реактивов.

1.1. Приготовление фосфатного буферного раствора панкреатина. Готовят 0,05 М фосфатный буфер рН 6,0 (0,875 г дигидрофосфата и 6,05 г натрия гидрофосфата растворяют примерно в 700 см³ дистиллированной воды в колбе на 1 дм³, затем доводят до метки дистиллированной водой).

Готовят раствор панкреатина с концентрацией панкреатина в 0,05 М фосфатном буфере 5 мг/см³.

1.2. Приготовление 0,5 %-ного водного раствора глюкоамилазы. Растворяют 500 мг глюкоамилазы в 100 см³ дистиллированной воды.

2. Подготовка образцов к анализу. Исследуемый сухой материал измельчают на лабораторной мельнице, просеивают через сито, собирая фракцию с размером частиц не более 1 мм; влажный материал гомогенизируют в гомогенизаторе.

При содержании жира в образцах более 5 % проводят обезжиривание. Для этого навеску образца, предназначенную для определения пищевых волокон, заливают трехкратным объемом петролейного эфира (к массе образца), перемешивают в течение 15 минут периодически и затем отстаивают не менее 1 минуты. Прозрачный раствор петролейного эфира декантируют и повторяют экстракцию с тем же количеством эфира 2 раза. Обезжиренный образец высушивают на воздухе.

3. Проведение анализа. 0,5 г тонкоизмельченного образца, взвешенного с точностью 0,0001 г, помещают в химический стакан и суспенди-

руют в 30 см^3 дистиллированной воды при температуре 40°C в течение 1,5 часа.

Полученную суспензию после настаивания нагревают на кипящей водяной бане для клейстеризации крахмала 30 мин при условии, что температура суспензии достигает 90°C .

После охлаждения смеси до комнатной температуры устанавливают рН 1,5 раствором соляной кислоты концентрацией 5 М, добавляют 100 мг пепсина (активность 1 мкг эквивалентна $5 \cdot 10^{-3}$ ПЕ_{НВ}) и ставят на инкубацию при температуре 40°C в течение 1...1,5 часа при периодическом помешивании. При недостаточной активности пепсина необходимо скорректировать его количество по описанной выше методике.

Смесь охлаждают до комнатной температуры, затем устанавливают рН 6,8 раствором гидроксида натрия концентрацией 3 М, приливают 10 см^3 0,05 М буферного раствора панкреатина. Смесь инкубируют в течение 1...1,5 часа при помешивании при температуре 40°C .

Охлаждают полученную смесь до комнатной температуры, приливают $1,0 \text{ см}^3$ водного раствора глюкоамилазы концентрацией 50 мг/см^3 (рекомендуется использовать 100 единиц активности глюкоамилазы на расщепление 1 г крахмала), устанавливают рН 4,8 раствором соляной кислоты концентрацией 5 М и инкубируют при температуре 40°C в течение 12 часов.

Полноту гидролиза крахмала определяют йодной пробой. Для этого несколько капель смеси с глюкоамилазой помещают на стекло, добавляют каплю йода в водном растворе йодида калия. О присутствии крахмала в препарате пищевых волокон судят по наличию окрашенных в синий цвет крахмальных зерен. В случае положительной реакции на крахмал проводят обработку смеси дополнительным количеством глюкоамилазы (приливают водный раствор глюкоамилазы концентрацией 5 мг/см^3 и инкубируют 1 ч при аналогичных условиях: рН 4,8 и температура 60°C).

Полученную смесь фильтруют через предварительно доведенный до постоянной массы фильтр № 100 или предварительно высушенный и взвешенный обеззоленный фильтр. Нерастворимые пищевые волокна, оставшиеся на фильтре, промывают последовательно 25 см^3 70 %-ного раствора этилового спирта (в два приема) и 25 см^3 ацетона (в два приема). Фильтрат должен быть прозрачным. Фильтр помещают в сушильный шкаф при температуре 105°C и высушивают до постоянной массы.

Фильтрат делят на две равные части. В одной части фильтрата осаждают растворимые пищевые волокна 4-кратным количеством

96 %-ного этилового спирта, взятым к объему фильтрата. Смесь оставляют для осаждения на 10...12 часов, затем фильтруют через доведенный до постоянной массы стеклянный пористый фильтр № 40 (при необходимости использовать слабый вакуум) до получения прозрачного фильтрата. Остаток на фильтре промывают последовательно 25 см³ 70 %-ного раствора этилового спирта и 25 см³ ацетона, затем высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы.

В полученных препаратах нерастворимых пищевых волокон определяют содержание неперевариваемого белка по методу Кьельдаля и золы по ГОСТу 10847-74.

Для корректировки данных по содержанию пищевых волокон от возможного осаждения остатка ферментов на растворимые и нерастворимые пищевые волокна параллельно проводят холостой опыт по вышеизложенной схеме, но без навески исследуемого образца. Холостой опыт важно проводить при использовании новых партий ферментов.

4. *Расчеты.* Содержание пищевых волокон в продукте определяют по следующим формулам.

Для нерастворимых пищевых волокон:

$$X_1 = M - (B + C) - \frac{M_2 \cdot 100}{M}.$$

Для растворимых пищевых волокон:

$$X_2 = M_3 - \frac{M_2 \cdot 100 \cdot 2}{M},$$

где X_1 — содержание нерастворимых пищевых волокон, г на 100 г продукта; X_2 — содержание растворимых пищевых волокон, г на 100 г продукта; M — навеска исследуемого образца, г; M_1 и M_3 — масса остатка нерастворимых или растворимых пищевых волокон после высушивания соответственно, г; M_2 — масса остатка в холостом опыте после высушивания, г; B — содержание белка в препарате пищевых волокон, г; C — содержание золы в препарате пищевых волокон, г (для продуктов, представленных в «Таблицах химического состава пищевых продуктов», возможно использование табличных данных).

Общее содержание пищевых волокон X вычисляют суммированием величин X_1 и X_2 . За окончательный результат определения массовой доли нерастворимых и растворимых пищевых волокон принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Вычисление проводят до второго десятичного знака с последующим округлением до первого десятичного знака.

2.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 2.2.1

Качественный анализ низкомолекулярных углеводов в пищевых продуктах: идентификация по функциональным группам по методу тонкослойной хроматографии

По химической природе моносахариды являются полигидроксиальдегидами (альдозами) или полигидроксикетонами (кетозами), которые в растворах существуют в виде таутомерных циклических форм (пираноз или фураноз), представляющих собой циклические полуацетали; в структурах полуацеталей оксо-группа (альдегидная или кетонная) преобразована в полуацетальный гидроксил. Продукты окисления углеводов (альдоновые, альдаровые или альдуроновые кислоты) содержат карбоксильные группы.

Функциональный анализ вещества на наличие перечисленных групп позволяет косвенно судить о его принадлежности к классу углеводов. Подтверждением этих предположений служат реакции на углеводы.

Цель работы: идентификация низкомолекулярных углеводов в составе пищевых порошкообразных продуктов с помощью функционального анализа и тонкослойной хроматографии.

1. Функциональный анализ

Функциональный анализ углеводов включает в себя открытие гидроксильных групп, карбонильной группы, карбоксильной группы, общей реакции на углеводы с 2-нафтолом и реакции Селиванова на кетозы.

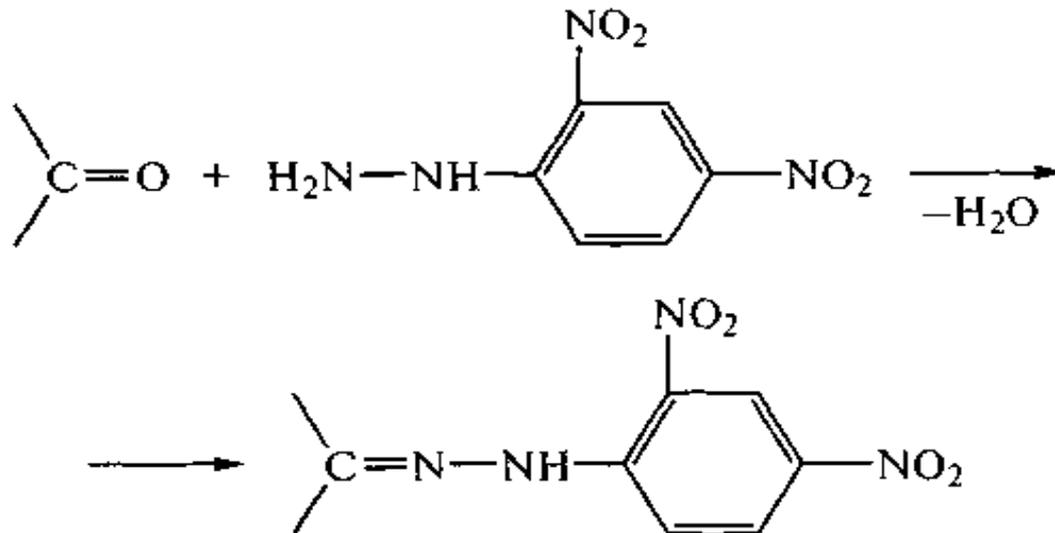
Открытие гидроксильных групп. Реакция с гидроксидом меди (комплексобразование многоатомных спиртов)

В двух-, трех- и многоатомных спиртах, в отличие от одноатомных, растворяется свежеприготовленный гидроксид меди с образованием окрашенных в ярко-синий цвет комплексных солей соответствующих производных (гликолятов, глицератов).

Реактивы и материалы:

- ♦ Исследуемый раствор.
- ♦ Этиленгликоль.

Методика проведения анализа. В три пробирки наливают по 10 капель солянокислого раствора 2,4-динитрофенилгидразина и добавляют: в первую — 2 капли формальдегида, во вторую — 2 капли ацетона, в третью — 10 капель исследуемого раствора. Наблюдают выпадение желтых осадков 2,4-динитрофенилгидразонов в контрольных пробирках.



В исследуемом растворе образование гидразонов затруднено, поэтому пробирку нагревают на водяной бане, помешивая палочкой, а затем охлаждают.

Вывод. При одинаковых результатах опыта с анализируемым и контрольными веществами делают вывод о наличии в составе исследуемого вещества оксогруппы.

Открытие карбоксильной группы. Качественные реакции соединений, содержащих карбоксильные группы, на индикаторы

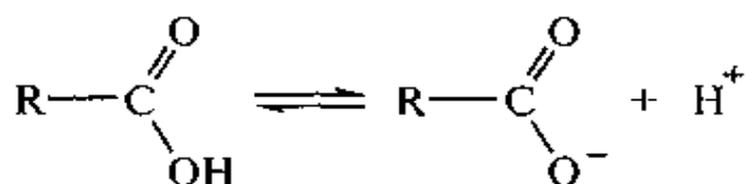
Реактивы и материалы:

- ♦ Исследуемый раствор.
- ♦ Муравьиная и уксусная кислоты.
- ♦ 2 %-ный раствор метилоранжа.
- ♦ Бумага синего лакмуса.

Методика проведения анализа.

А. В пробирки помещают по 5 капель каждой из исследуемых кислот, добавляют по 5 капель воды и 1 каплю метилоранжа. Отмечают в каких пробирках появляется красное окрашивание.

Б. То же проделывают, что и в предыдущем опыте, но испытывают растворы кислот лакмусом. Соединения, содержащие карбоксильные группы, в водных растворах дают кислую реакцию на лакмус.



Качественная реакция соединений, содержащих карбоксильные группы, с дикарбонатом натрия

Реактивы и материалы:

- ♦ Исследуемый раствор.
- ♦ Муравьиная и уксусная кислоты.
- ♦ 5 %-ный раствор соды.

Методика проведения анализа. В три пробирки наливают по 10 капель 5 %-ного раствора соды и добавляют по 5 капель в первую — муравьиной, во вторую — уксусной кислоты, в третью — исследуемого раствора. Наблюдают выделение CO_2 .

Выделение двуокиси углерода при добавлении растворов кислот к водному раствору бикарбоната натрия может являться доказательством наличия карбоксильной группы.

Открытие углеводов. Общая реакция на углеводы с α -нафтолом

Реактивы и материалы:

- ♦ Исследуемый раствор.
- ♦ 5 %-ный раствор глюкозы, фруктозы, лактозы, сахарозы.
- ♦ 10 %-ный раствор α -нафтола в спирте.
- ♦ Серная кислота ($\rho = 1,84$).

Методика проведения анализа. В сухие пробирки помещают по 10 капель растворов углеводов и исследуемого раствора. Затем добавляют в каждую пробирку по 5 капель раствора α -нафтола. После этого, наклонив пробирку, осторожно приливают по стенке из пипетки 1...2 капли концентрированной серной кислоты. На границе слоев быстро образуется красно-фиолетовое кольцо, при взбалтывании смесь разогревается и окрашивается по всему объему, а при разбавлении ее водой выделяются окрашенные хлопья. При отсутствии углеводов фиолетовое кольцо не образуется, хотя жидкость может позеленеть или пожелтеть. Появление фиолетовой окраски при реакции углеводов с α -нафтолом обусловлено расщеплением молекулы углевода при действии концентрированной серной кислоты с образованием

в числе прочих продуктов фурфурола или его производных, которые вступают в реакцию конденсации с α -нафтолом, образуя окрашенные соединения.

Вывод. Сравнивая результаты опытов, делают вывод о принадлежности анализируемого вещества к классу углеводов.

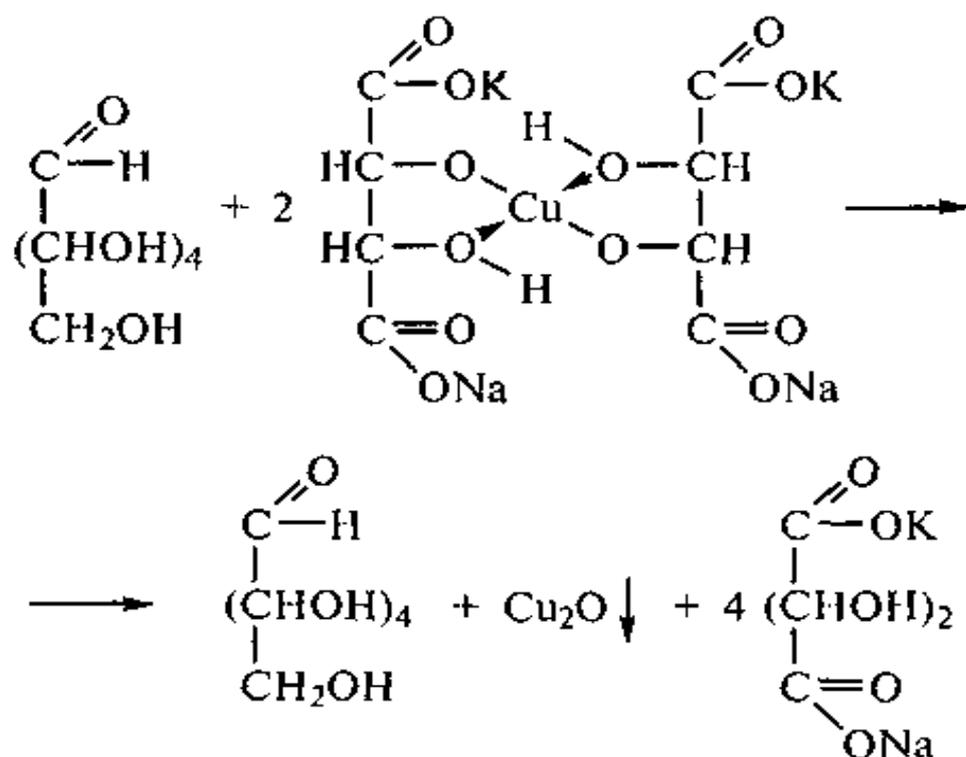
*Взаимодействие сахаров с медновиннокислым комплексом
(реактив Фелинга)*

Реактивы и материалы:

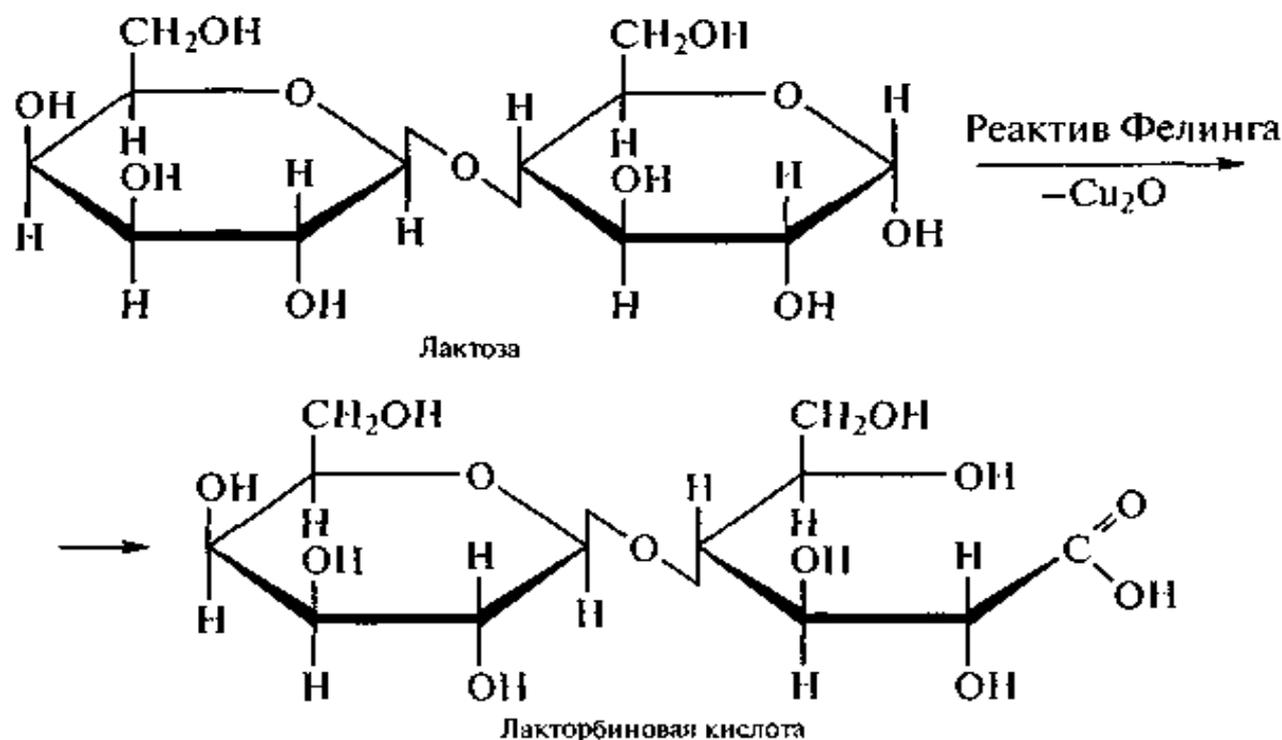
- ♦ Исследуемый раствор.
- ♦ 5 %-ные растворы глюкозы, лактозы, сахарозы.
- ♦ Реактив Фелинга — смесь растворов А и Б:
 - раствор А: 4 %-ный раствор сульфата меди,
 - раствор Б: щелочной раствор тартрата калия-натрия.

Методика проведения анализа. Для приготовления реактива Фелинга в отдельной пробирке смешивают 10 капель раствора А и 10 капель раствора Б и используют в дальнейшей работе.

В четыре пробирки наливают по 3 капли растворов сахаров — в первую — глюкозу, во вторую — лактозу, в третью — сахарозу, а в четвертую — 10 капель исследуемого раствора. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 капли реактива Фелинга и нагревают их на водяной бане. Наблюдают выпадение оксида меди (I) в пробирках с глюкозой и лактозой. В пробирке с сахарозой сохраняется синий цвет.



Восстанавливать соединения меди из реактива Фелинга при нагревании способны лишь те сахара, которые имеют в молекуле свободную альдегидную группу или гликозидный гидроксил.



Сахароза не восстанавливает раствор Фелинга, что указывает на отсутствие в ее молекуле свободной альдегидной группы.

Вывод. По результатам опытов делают вывод о строении исследуемого углевода.

Реакция Селиванова на кетозы

Реактивы и материалы:

- Исследуемый раствор.
- 5 %-ный раствор фруктозы, сахарозы.
- Соляная кислота ($\rho = 1,19$).
- 1 %-ный раствор резорцина.

Методика проведения анализа. В три пробирки помещают по 4 капли раствора резорцина и по 4 капли соляной кислоты. Затем добавляют в первую пробирку 4 капли раствора фруктозы, во вторую — 4 капли раствора сахарозы, в третью — 8 капель исследуемого раствора. Все пробирки помещают на 2 минуты в кипящую водяную баню.

При нагревании с концентрированными минеральными кислотами (соляной, серной) молекулы гексоз постепенно расщепляются, образуя смесь различных продуктов. В числе других веществ они образуют оксиметилфурфурол, который конденсируется с резорцином с

2...7 мм, отступая от бокового и нижнего краев пластинки на расстояние 10 мм. Пластинку вертикально помещают в камеру, которая заполнена разделяющей смесью до высоты 5 мм. Состав разделяющей смеси: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (60 см³ — 15 см³ — 25 см³).

Пластинку выдерживают в камере до тех пор, пока высота подъема фронта восходящего растворителя не достигнет отмеченной длины разделительного пути. Разделительный путь (расстояние от линии старта до фронта растворителя) равен 90 мм. По окончании хроматографического разделения пластинку вынимают из камеры и сушат при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного исправления остатков растворителей.

Затем разделение повторяют в той же системе растворителей. Высушенные пластинки погружают в реагент, представляющий собой следующую смесь: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота — фосфорная кислота — анилин — дифениламин (60 см³ — 25 см³ — 15 см³ — 10 см³ — 1 см³ — 2 г). Пластинки снова высушивают и проявляют в термостате при температуре 120 °С в течение 5 мин. Проявленные фракции имеют различную окраску на белом фоне пластинок.

Идентификацию сахаров проводят с помощью свидетелей и по значениям R_f . Данные заносят в таблицу (табл. 2.3) в графу для расчетных значений.

Таблица 2.3

Результаты тонкослойной хроматографии

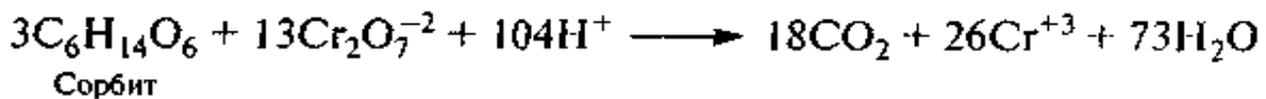
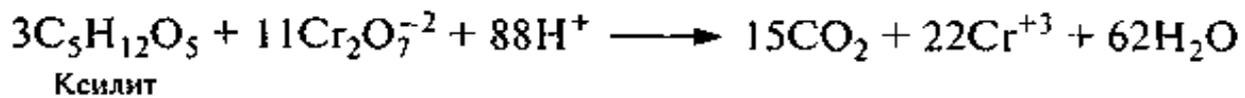
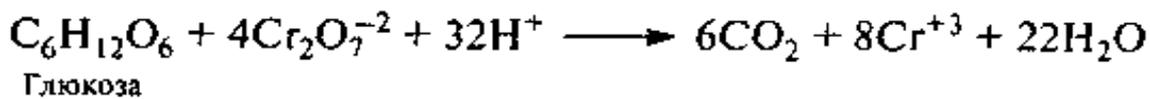
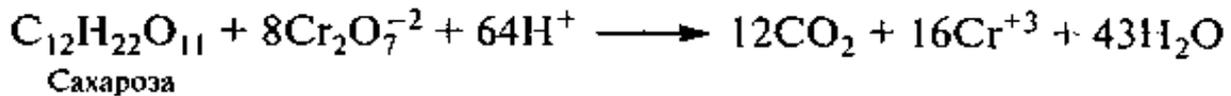
Углеводы	Цвет пятна	Значение R_f	
		теоретическое	расчетное
Моносахариды:			
глюкоза	Оливково-серый	0,36	
фруктоза	Красный	0,37	
ксилоза	Зеленый	0,45	
Дисахариды:			
мальтоза	Серо-голубой	0,25	
лактоза	Оливково-серый	0,20	
сахароза	Коричневый	0,28	
Исследуемое вещество			

По результатам исследования делается заключительный вывод о структуре исследуемого вещества.

Лабораторная работа 2.2.2

Определение содержания общего сахара в продуктах кондитерского производства

Общий сахар — это суммарное содержание сахарозы и восстанавливающих сахаров, выраженное в процентах сахарозы. Метод основан на окислении сахаров дихроматом калия в сильноокислой среде:



Соединения хрома(III) — окрашены в сине-зеленый цвет, их количество пропорционально содержанию общего сахара в анализируемом продукте.

Цель работы: определение содержания общего сахара в продуктах кондитерского производства.

Реактивы и материалы:

- ♦ Раствор сахарозы — 0,004 г/см³ (стандартный раствор сахарозы). 1,0000 г сахарозы взвешивают с точностью до 0,0002 г и растворяют в мерной колбе вместимостью 250 см³. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой.

- ♦ 1 %-ный раствор дихромата калия (основной реактив). 49 г дихромата калия растворяют при нагревании в 300 см³ воды, отдельно в 300 см³ воды медленно при перемешивании вводят 300 см³ концентрированной H₂SO₄ и охлаждают. В мерную колбу вместимостью 1000 см³ сначала помещают раствор дихромата калия, затем — серную кислоту, объем раствора доводят водой до метки, осторожно перемешивают.

- ♦ Серная кислота — плотность 1,84 г/см³.

- ♦ 0,5 М раствор сульфата цинка.

- ♦ 1 М раствор гидроксида натрия.

Методика проведения анализа. 1. Построение градуировочного графика. В 6 мерных колб вместимостью 100 см³ вносят по 25 см³ раствора дихромата калия. Из бюретки последовательно

добавляют 0; 2; 4; 6; 8 и 20 см³ стандартного раствора сахарозы. Затем во все колбы из бюретки приливают дистиллированную воду до объема 50 см³, (т. е. добавляют 25, 23, 21, 19, 17 и 5 см³ воды). Получают серии растворов, содержащих соответственно 0, 8, 16, 24, 32 и 80 мг сахарозы в 100 см³.

Содержимое колбы нагревают на кипящей водяной бане 10 мин, охлаждают под струей водопроводной воды, объем растворов доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученных растворов на фотоэлектроколориметре при длине волны 670 нм и толщине кюветы 5 см. Раствором сравнения является раствор с нулевой концентрацией сахарозы. Оптическую плотность определяют в каждом растворе не менее 3 раз.

Для построения калибровочного графика в координатах «оптическая плотность — количество сахарозы, мг/100 см³» используют среднее значение оптической плотности (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Данные для построения градуировочного графика

№ п/п	Количество сахарозы,	Концентрация сахарозы, мг/100 см ³	Оптическая плотность			
			A ₁	A ₂	A ₃	A _{ср}
1	0	0				
2	2	8				
3	4	16				
4	6	24				
5	8	32				
6	20	80				

2. Подготовка проб для анализа. Анализируемый образец измельчают в ступке. Затем готовят водную вытяжку объекта исследования. Примерные навески для различных пищевых объектов приведены в табл. 2.5. Навеску с точностью до 0,01 г переносят в мерную колбу вместимостью, определенной по табл. 2.5 в зависимости от взятой пробы.

Навеску растворяют в дистиллированной воде, нагретой до 60 °С:

А. Если изделие растворяется в воде без остатка (сахарные леденцы, сиропы и др.), то полученный в стаканчике раствор охлаждают и переносят в мерную колбу. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой и хорошо перемешивают.

Таблица 2.5

Примерные навески пищевых продуктов для определения содержания сахаров

Наименование объекта	Навеска, г	Вместимость мерной колбы для приготовления вытяжки, см ³	Объем на определение, см ³	Содержание сахаров в объекте, %
Хлеб, мука, галеты	5	100	10	1...2
Хлебобулочные изделия с добавлением сахара, несладкое печенье	4	100	5...10	2...5
Натуральные соки (кроме виноградного)	4	100	5...10	2...5
Хлеб ржаной, сдобные хлебобулочные изделия	2	100	5...10	5...10
Напитки, фруктовые пюре с сахаром	2	100	5...10	5...10
Сухари сдобные, печенье, крепленые вина, виноградный сок	1,5	100	5...10	10...20
Детские молочные смеси, полуфабрикаты, печенье, торты, кексы	2	250	5...10	20...40
Молочная смесь «Малютка», корпуса конфет, джемы, повидло	1	200	5...10	40...60
Варенье, шоколад	1	250	5	60 и выше
Сухие смеси, кисели и т. д.	2	500	5	60 и выше

Б. Если в изделии находятся вещества, нерастворимые в воде «мешающие несакхара» — белки, жиры, пектины, крахмал и т. п., то навеску переносят в мерную колбу, смывая частицы дистиллированной водой. Объем жидкости должен быть примерно равен половине объема мерной колбы.

Колбу с жидкостью помещают на водяную баню, нагретую до 60 °С (для объектов, содержащих крахмал — до 50 °С). При этой температуре выдерживают колбу в течение 15 мин, периодически перемешивая. За это время практически все сахара переходят в раствор. Охладив раствор, осаждают «мешающие несакхара», прибавляя к нему 5 см³ 0,5 М раствора ZnSO₄ и 2,5 см³ 1 М раствора КОН или NaOH. Раствор доводят до метки и фильтруют.

3. Определение общего сахара. В мерную колбу вместимостью 100 см³ отбирают цилиндром 25 см³ раствора дихромата калия, 10 см³ прозрачного фильтрата и 15 см³ воды, нагревают в течение 10 мин на кипящей водяной бане, охлаждают, добавляют до метки воду, перемешивают. Полученным раствором заполняют кювету и опре-

деляют оптическую плотность также, как и при снятии градуировочного графика.

По градуировочному графику находят содержание сахарозы (мг/100 см³) раствора, что соответствует содержанию сахарозы во взятой пробе, выраженному в мг.

Содержание общего сахара X (%) в анализируемом продукте вычисляют по формуле:

$$X = \frac{gV_1 \cdot 100}{V_2m \cdot 1000},$$

где g — содержание общего сахара, найденное по градуировочному графику, мг/100 мл; V_1 — вместимость мерной колбы, мл; V_2 — объем фильтрата, взятый для реакции с дихроматом калия, мл; m — масса навески объекта исследования, г.

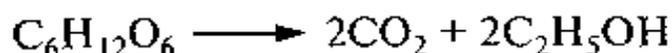
Лабораторная работа 2.2.3

Изменение содержания сахаров в процессе приготовления хлеба

Одной из основных технологических стадий при производстве хлеба является тестоприготовление. Состояние и свойства готового к разделке теста в значительной мере определяют его дальнейшее состояние при формовании, расстойке и выпечке и в конечном счете определяют качество хлеба.

В процессе приготовления теста составные части муки (ее белково-протеиназные и углеводно-амилазные комплексы) претерпевают существенные изменения. Эти изменения связаны с процессами брожения и созревания теста.

При приготовлении теста на прессованных дрожжах основную роль играет спиртовое брожение, вызываемое дрожжами вида *Saccharomyces cerevisiae*. При этом происходит сбраживание сахаров, содержащихся в тесте, по следующей реакции:



Источником сбраживаемых дрожжами сахаров при тестоприготовлении служат как собственные сахара муки, содержание которых составляет 1,0...2,5 %, так и сахара, образующиеся за счет ферментативного гидролиза крахмала муки.

Собственные сахара муки (глюкоза, фруктоза, сахароза) быстро сбраживаются дрожжами. Одновременно, за счет гидролиза крахмала

ферментом β -амилазой, содержащейся в муке, образуется мальтоза. Мальтоза не сбраживается дрожжами непосредственно, а лишь после гидролиза α -глюкозидазой, содержащейся в дрожжах. Таким образом, происходит сбраживание глюкозы и фруктозы и одновременно образование мальтозы. В зависимости от того, какой процесс преобладает, может происходить либо уменьшение, либо увеличение общего количества сахаров в тесте в процессе его брожения.

Увеличение количества сбраживаемых сахаров может быть достигнуто также внесением в тесто промышленных ферментных препаратов, таких как Амилоризин П10х и др.

Для получения хлеба с хорошим вкусом и ароматом и нормально окрашенной коркой необходимо, чтобы количество несброженных к моменту выпечки сахаров в тесте было не менее 2...3 % на сухое вещество. Это связано с тем, что восстанавливающие сахара, взаимодействуя с аминными компонентами муки, образуют темно-окрашенные продукты меланоидины. Основными характерными признаками реакции меланоидинообразования являются снижение содержания восстанавливающих веществ и азота аминных групп, появление ароматообразующих веществ.

Цель работы: изучение изменения содержания сахаров в процессе брожения теста и выпечки хлеба.

Реактивы и материалы:

- ♦ 1 н. раствор дихромат калия (49 г дихромата калия растворяют при нагревании в 300 см³ воды, отдельно в 300 см³ воды медленно при перемешивании вводят 300 см³ концентрированной H₂SO₄ и охлаждают. В мерную колбу вместимостью 1000 см³ сначала помещают раствор дихромата калия, затем — серную кислоту, объем раствора доводят водой до метки, осторожно перемешивают).

- ♦ Стандартный раствор сахарозы — 0,004 г/см³ (1,0000 г сахарозы взвешивают с точностью до 0,0002 г и растворяют в мерной колбе вместимостью 250 см³, доводят объем до метки дистиллированной водой).

- ♦ Серная кислота — плотность 1,84 г/см³.
- ♦ 0,5 М раствор сульфата цинка.
- ♦ 1 М раствор гидроксида натрия.
- ♦ Ферментный препарат (амилоризин и др.).

Методика проведения анализа.

1. Построение градуировочного графика. См. лаб. раб. 2.2.2.

2. Подготовка проб для анализа сахаров.

Подготовка проб муки для анализа сахаров. Навеску муки массой 5 г, взятую с точностью 0,1 г, переносят в мерную

колбу вместимостью 100 см³, смывая нерастворимые частицы в колбу с дистиллированной водой. Объем жидкости должен быть примерно равен половине объема мерной колбы. Колбу помещают на водяную баню, нагретую до 50 °С, и выдерживают ее в течение 15 минут, периодически перемешивая. За это время при такой обработке практически все сахара переходят в раствор. Охладив колбу с раствором под струей воды, осаждают «мешающие несакхара» (белки, жиры, пектин, крахмал и т. п.), прибавляя к нему 5 см³ 0,5 М раствора сульфата цинка и 5 см³ раствора 1 М КОН или NaOH.

Содержимое колбы хорошо перемешивают, доводят объем колбы до метки дистиллированной водой и оставляют в покое на 15 минут. Отстоявшуюся жидкость фильтруют через складчатый фильтр в сухую коническую колбу.

Подготовка проб теста для анализа сахаров. Для изучения процесса накопления сбраживаемых сахаров под действием ферментов (как собственных, так и вносимых ферментных препаратов), а также потребления их в процессе брожения теста и выпечки хлеба следует приготовить 4 образца теста в соответствии с рецептурами, приведенными в табл. 2.6.

Таблица 2.6

Рецептуры проб теста для анализа сахаров

Наименование используемого сырья	Количество сырья для приготовления теста, г			
	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Мука пшеничная I сорта, г	100	100	100	100
Дрожжи прессованные, г	2,5	2,5	—	—
Соль, г	1,5	1,5	1,5	1,5
Ферментный препарат Амилолизин ¹⁾	—	0,01 г → 50 мл → 10 мл	—	0,01 г → 50 мл → 10 мл
Вода ²⁾ , см ³	58,7	48,7	58,7	48,7

¹⁾ Количество ферментного препарата рассчитывается с учетом его амилолитической активности (АС). При активности 2000 ед/г фермента для получения теста с оптимальными свойствами необходимо внести 4,5 ед. АС на 100 г муки. Для этого надо взвесить 0,01000 г фермента, растворить в колбе на 50 см³, довести объем раствора до метки и 10 см³ этого раствора внести в тесто.

²⁾ Количество воды рассчитано с учетом влажности муки 12%.

Приготовленные образцы теста помещают в термостат и выдерживают в течение 3 часов при температуре 30...32 °С.

Отбор проб для определения содержания сахаров производят сразу же после замеса теста, а затем через 0,5; 1,0; 1,5 и 3,0 часов термостатирования.

По истечении 3 часов термостатирования образцы теста вынимают из термостата и помещают в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 130...150 °С и выдерживают в течение 20 минут. После чего образец теста вынимают, охлаждают и готовят из них пробы для анализа сахаров.

Для этого навеску теста массой 10 г, взятую с точностью 0,1 г, тщательно растирают в ступке с небольшим количеством воды, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, смывая нерастворимые частицы в колбу дистиллированной водой.

Объем жидкости должен быть примерно равен половине объема мерной колбы. Колбу затем помещают на водяную баню, нагретую до 50 °С и выдерживают ее в течение 15 минут, периодически помешивая. За это время при такой обработке практически все сахара переходят в раствор.

Охладив колбу с раствором под струей воды, осаждают «мешающие сахара» (белки, жиры, пектин, крахмал и т. п.), прибавляя к нему 5 см³ 0,5 М раствора сульфата цинка и 5 см³ раствора 1 М КОН или NaOH.

Содержимое колбы хорошо перемешивают, доводят объем колбы до метки дистиллированной водой и оставляют в покое на 15 минут. Отстоявшуюся жидкость фильтруют через складчатый фильтр в сухую коническую колбу.

3. *Определение общего сахара в пробах теста и хлеба.* В мерную колбу вместимостью 100 см³ отбирают цилиндром 25 см³ раствора дихромата калия, 10 см³ прозрачного фильтрата и 15 см³ дистиллированной воды, нагревают в течение 10 мин на кипящей водяной бане, охлаждают, добавляют воды до метки и перемешивают раствор. Полученным раствором заполняют кювету (с толщиной слоя 5 см) и определяют оптическую плотность против раствора сравнения (с нулевым содержанием сахарозы), так же как при снятии градуировочного графика (см. лаб. раб. 2.2.2). Полученные данные записывают в таблицы (по образцу табл. 2.7 и табл. 2.8).

Таблица 2.7

Результаты определения общего сахара в муке

№ п/п	Номер пробы муки	Оптическая плотность			
		A_1	A_2	A_3	$A_{ср}$
1	1				
2	2				
3	3				

Таблица 2.8

Результаты определения оптической плотности в пробах теста

№ п/п	Пробы теста	Время отбора проб, ч	Оптическая плотность			
			A_1	A_2	A_3	A_4
1	С ферментом	0,0				
2	» »	0,5				
3	» »	1,0				
4	» »	1,5				
5	» »	3,0				
6	Без фермента	0,0				
7	» »	0,5				
8	» »	1,0				
9	» »	1,5				
10	» »	3,0				

По градуировочному графику находят содержание сахарозы в пробе (в мг/100 см³ раствора).

Содержание общего сахара X (в %) в анализируемом продукте вычисляют по формуле:

$$X = \frac{gV_1 \cdot 100}{V_2m \cdot 1000}$$

где g — содержание общего сахара, найденное по градуировочному графику, мг/100 см³; V_1 — вместимость мерной колбы, мл; V_2 — объем фильтрата, взятый для реакции с дихроматом калия, см³; m — масса навески объекта исследования, г.

Данные записывают в таблицу (см. табл. 2.9).

Таблица 2.9

Расчет содержания общего сахара в пробах теста

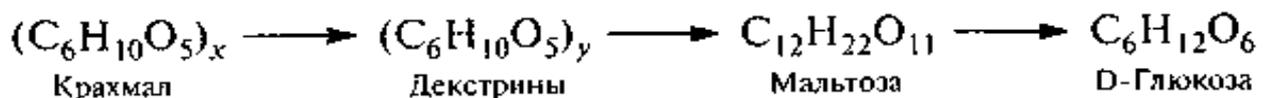
№ п/п	Время отбора пробы, ч	Пробы теста			
		с дрожжами		без дрожжей	
		без фермента, образец 1	с ферментом, образец 2	без фермента, образец 3	с ферментом, образец 4
1	0,0				
2	0,5				
3	1,0				
4	1,5				
5	3,0				

На основании полученных результатов делают вывод об изменении содержания общего сахара в процессе приготовления хлеба и влиянии ферментного препарата на накопление сахаров при тестоведении.

Лабораторная работа 2.2.4

Кислотный гидролиз крахмала и идентификация продуктов гидролиза

При нагревании крахмала с разбавленными кислотами происходит его гидролиз по следующей схеме:



Цель работы: на примере кислотного гидролиза крахмала изучить процесс последовательной деполимеризации гомополисахарида. С помощью хроматографического анализа идентифицировать продукты гидролиза и определить их относительное содержание.

Реактивы и материалы:

- ♦ Крахмальный клейстер (1,5 г крахмала в 25 см³).
- ♦ 10 %-ный раствор серной кислоты.
- ♦ 0,1 н. раствор йода в KI.
- ♦ Пластинки «Силуфол» для тонкослойной хроматографии.
- ♦ Разделяющая система растворителей: *n*-бутанол — ледяная уксусная кислота — дистиллированная вода в соотношении 60 : 15 : 25.
- ♦ Реагент для проявления пластинок: смесь *n*-бутанола (60 см³) — воды (25 см³) — ледяной уксусной кислоты (15 см³) — фосфорной кислоты (10 см³) — анилина (1 см³) — дифениламина (2 г).

Методика проведения анализа. В мерную пробирку помещают 2 см³ крахмального клейстера и 6 капель раствора серной кислоты. Содержание пробирки встряхивают и ставят в стакан вместимостью 50 см³ с кипящей водой. Каждые 2 минуты отбирают пипеткой каплю раствора и переносят в пробирку с раствором йода. Для этого предварительно в 8 пробирок помещают по одной капле раствора йода и 5 капель воды. Последовательные пробы обнаруживают постепенное изменение окраски при реакции с йодом (синюю, сине-фиолетовую, красно-фиолетовую, красновато-оранжевую, оранжевую и желтую).

Гидролиз крахмала заканчивают, когда крахмальный клейстер не будет давать цветной реакции с йодом. Отмечают общую продолжительность гидролиза. Известно, что крахмал с йодом дает синее окра-

шивание. Декстрины, в зависимости от величины цепочки, окрашиваются йодом в фиолетовые, красные и оранжевые цвета. Мальтоза и глюкоза не изменяют окраски йода.

По окончании гидролиза проводят анализ реакционной смеси методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Методика проведения анализа гидролизата крахмала методом ТСХ. На подготовленную пластинку «Силуфол» с помощью хроматографического микрошприца наносят 1 мкл гидролизата в виде сплошной полосы длиной 2...7 мм, отступая от бокового и нижнего краев пластинки на расстояние 10 мм. Пластинку вертикально помещают в хроматографическую камеру, которая заполнена разделяющей смесью до высоты 5 мм. Состав разделяющей смеси: *n*-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода в соотношении 60 : 15 : 25. Пластинку выдерживают в камере до тех пор, пока высота подъема фронта восходящего растворителя не достигнет отмеченной длины разделительного пути. Разделительный путь (расстояние от линии старта до линии растворителя) равен 90 мм.

По окончании хроматографического разделения пластинку вынимают из камеры и сушат при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного испарения остатков растворителей.

Затем разделение повторяют в той же системе растворителей. Высушенные пластинки погружают в реагент, представляющий собой следующую смесь: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота — фосфорная кислота — анилин — дифениламин в количественном соотношении: 60 см³ — 25 см³ — 15 см³ — 10 см³ — 1 см³ — 2 г. Пластинки снова высушивают и проявляют в термостате при температуре 120 °С в течение 5 минут.

Идентификацию продуктов гидролиза проводят с помощью свидетелей и по значениям R_f (см. табл. 2.3, с. 77). Количественная оценка проводится с помощью специального прибора — денситометра, позволяющего получать результаты измерений в виде графической записи кривой зависимости оптической плотности по площади зоны.

При расчете концентраций компонентов исследуемой смеси используют метод внутренней нормализации. Концентрация каждого компонента смеси в относительных процентах вычисляется по формуле:

$$C_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \cdot 100\%,$$

где S_i — геометрическая площадь соответствующего пика на денситограмме.

Результаты вычислений приводят в таблице (табл. 2.10).

Таблица 2.10

Результаты хроматографического анализа продуктов кислотного гидролиза крахмала

№ п/п	Название компонента смеси	R_f	Цвет пятна	Относительное содержание компонента, %
1	Декстрины			
2	Мальтоза	0,25	Серо-голубой	
3	D-глюкоза	0,36	Оливково-серый	

По окончании исследования делают вывод о продолжительности процесса до исчезновения контрольной окраски йода, фактическом составе гидролизной смеси и относительном содержании компонентов.

Контрольные вопросы

1. Какие методы анализа используются для определения углеводов?
2. Что представляет собой функциональный анализ углеводов?
3. На какой реакции основан метод определения общего сахара? Какой прибор используется? Принцип построения градуировочного графика?
4. Какие углеводы относятся к неусваиваемым углеводам? Какие методы анализа используются для определения неусваиваемых углеводов?
5. Какие полисахариды относятся к усваиваемым углеводам? Назовите методы их определения.
6. На чем основаны химические методы определения моно- и олигосахаридов?
7. Что такое пищевые волокна? На чем основано определение пищевых волокон в пищевых продуктах?
8. На чем основан хроматографический анализ? Общая схема газохроматографического анализа сахаров?

ЛИПИДЫ

Липиды широко распространены в природе и вместе с белками и углеводами составляют основную массу органических веществ живой клетки. Липиды — важные компоненты пищи, широко используются при получении разнообразных, в том числе жировых, продуктов питания, во многом определяя их пищевую, биологическую полноценность и вкусовые достоинства.

Анализ липидов и продуктов их превращения является сложной задачей и требует применения, наряду с классическими методами, современных физико-химических методов анализа (хроматографии, спектроскопии, рентгеноструктурного анализа и др.).

Изучение липидов начинают с определения их количества в пищевом объекте. Для этого используют два подхода:

а) определяют содержание липидов непосредственно в объекте, например методом ЯМР, инфракрасной спектроскопии и другими;

б) проводят анализ количественного содержания липидов после их предварительного извлечения из объекта — экстракции.

Эффективность экстракции липидов в значительной степени зависит от химической природы липидных компонентов и от вида комплексов, которые образуют липиды в клетке с другими классами веществ.

Липиды условно классифицируются на «свободные», «связанные» и «прочносвязанные» в зависимости от типов связей липидов с другими веществами клетки.

Для «свободных» липидов характерно ван-дер-ваальсово гидрофобное взаимодействие, при котором возникают слабые нековалентные связи углеводородных цепей неполярных липидов с гидрофобными участками белков или другими соединениями. «Свободные» липиды выделяют из объекта исчерпывающей экстракцией неполярными или малополярными растворителями, такими как диэтиловый эфир, гексан и др.

В «связанных» липидах электростатическое или гидрофобное взаимодействие полярных липидов с протеинами и др. (в мембранах, митохондриях, липопротеинах и т. п.) поддерживается водородными

связями. Для извлечения «связанных» липидов необходимо присутствие в экстрагирующей системе таких полярных растворителей, как этанол или метанол, которые разрывают водородные связи и разрушают электростатическое взаимодействие липидов с белками. «Связанные» липиды, как правило, извлекают методом исчерпывающей экстракции диэтиловым эфиром или гексаном из предварительно обезжиренного материала после его обработки кипящим этанолом.

Ковалентно связанные или «прочносвязанные» липиды не экстрагируются никакими растворителями. «Прочносвязанные» липиды выделяют после специальной обработки шрота щелочами или минеральными кислотами.

«Общие», или «суммарные» липиды (включая липиды, связанные с белком, углеводами), извлекают из материала системами растворителей, содержащими спирт. Спирт разрушает комплексы липидов с белками, растворяет липиды и дезактивирует ферменты, расщепляющие

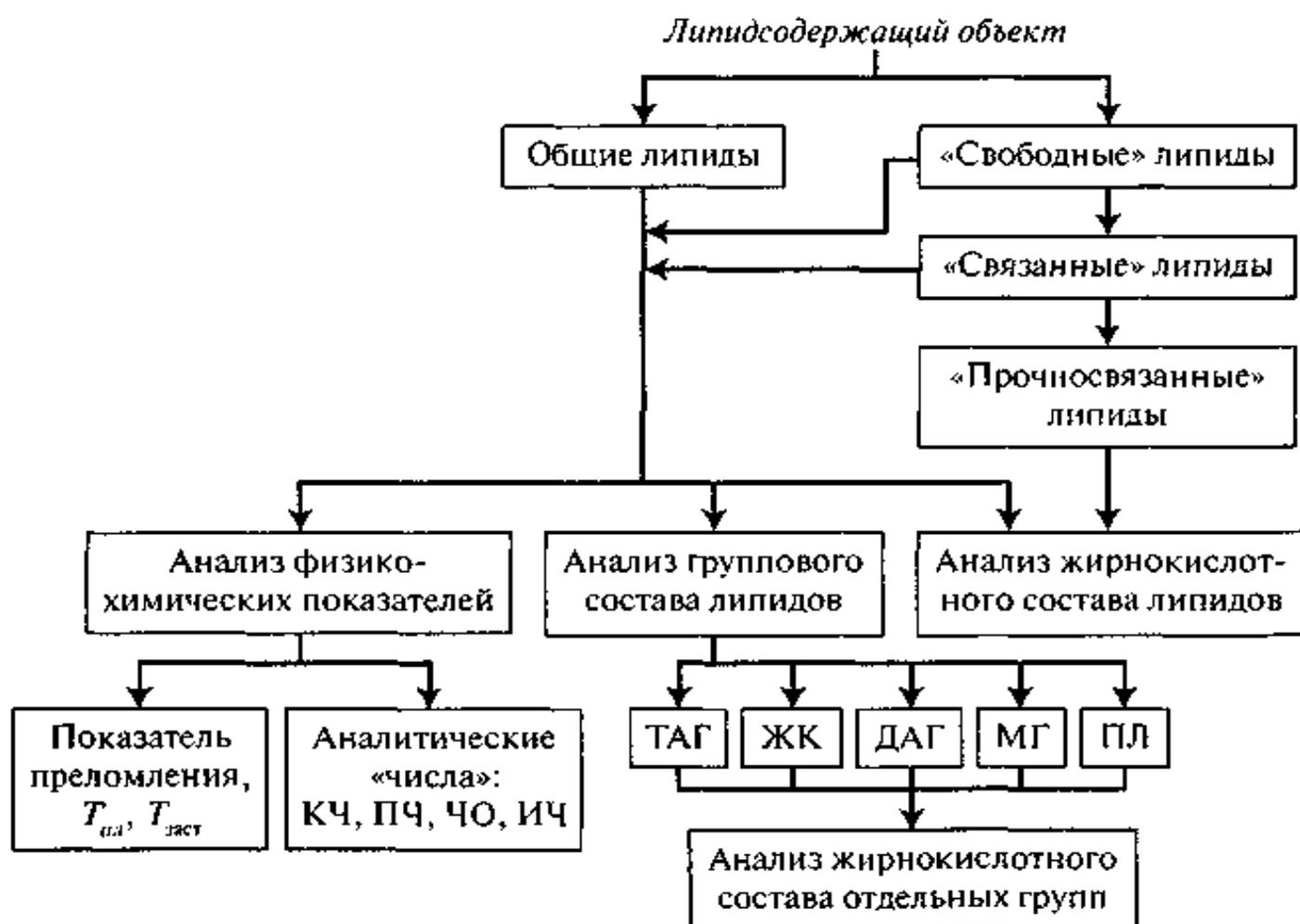


Рис. 3.1. Общая схема выделения и анализа липидов (КЧ — кислотное число; ПЧ — перекисное число; ЧО — число омыления; ИЧ — иодное число; TAG — триацилглицерины; DAG — диацилглицерины; МГ — моноацилглицерины; ЖК — жирные кислоты; ПЛ — полярные липиды)

липиды. Однако смеси растворителей, включающие спирт, наряду с липидами экстрагируют содержащиеся в объектах нелипидные компоненты, которые после окончания экстракции необходимо удалить.

В зависимости от поставленной цели исследователи выбирают наиболее приемлемый способ экстракции, руководствуясь главным принципом — количественное извлечение в максимально неизменном виде.

Общая схема выделения и анализа липидов приведена на рис. 3.1.

3.1. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

3.1.1. Определение общего содержания липидов методом экстракции смесью Фолча

Липиды экстрагируют из исследуемого объекта смесью Фолча, экстракт отмывают от нелипидных компонентов солевым раствором. Количественное определение липидов проводят весовым методом.

Реактивы и материалы:

- ♦ Смесью хлороформ — метанол (2 : 1 по объему) — смесь 1 (смесь Фолча).
- ♦ NaCl — 0,73 % водный раствор.
- ♦ Смесью растворителей: хлороформ — метанол — водный раствор NaCl в соотношении 3 : 48 : 47 — смесь 2.

Методика проведения анализа. Измельченную навеску (300...500 мг) помещают в гомогенизатор с тefлоновым или стеклянным пестиком, добавляют 5 объемов смеси 1 и гомогенизируют в течение 5 минут. Экстракт отделяют от биомассы, сливают в мерный цилиндр. Процедуру повторяют еще 2...3 раза. Измельченную ткань вместе с экстрактом количественно переносят в мерный цилиндр (конечное разведение 1 : 20), перемешивают и через 20 минут фильтруют через обезжиренный фильтр или центрифугируют при 1000 g в течение 15...20 минут. К центрифугату добавляют 0,73 % водный раствор хлорида натрия в объеме, составляющим 20 % от объема экстракта липидов. Экстракт перемешивают и центрифугируют при 600 g в течение 15...20 минут. После центрифугирования система разделяется на две фазы. Верхнюю фазу осторожно отбирают с помощью шприца или пипетки с оттянутым концом и отбрасывают. Поверхность нижней фазы и внутренние стенки центрифужной пробирки ополаскивают 3 см³ смеси 2, тща-

тельно следя за тем, чтобы не было перемешивания нижней фазы и промывной смеси. Последнюю отбрасывают и промывание повторяют еще 2 раза. После удаления промывной смеси к нижней фазе, то есть к хлороформному раствору липидов, прибавляют по каплям метанол до образования однофазной системы, раствор перемешивают.

Количество липидов определяют весовым методом.

Круглодонную колбу для роторного испарителя доводят до постоянного веса, взвешивают на аналитических весах и помещают в нее экстракт липидов, содержащий не менее 10...20 мг липидов, растворитель упаривают на роторном испарителе. Колбу с осадком липидов доводят до постоянного веса в вакуум-эксикаторе над КОН. Путем повторного взвешивания на аналитических весах определяют вес осадка липидов и рассчитывают содержание липидов в исследуемом материале в процентах с учетом взятой навески.

3.1.2. Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов методом экстракции по Блайя — Дайеру

Для экстракции общих липидов часто применяют метод Блайя — Дайера.

По методу Блайя — Дайера используют систему растворителей этанол — хлороформ — вода с последующим разделением несмешивающихся слоев жидкостей. После отделения хлороформного слоя, содержащего липиды, его очищают от нелипидных примесей.

Реактивы и материалы:

- ♦ Хлороформ.
- ♦ Этанол.

Методика проведения анализа. Навеску измельченного продукта 5...10 г, взвешенную с погрешностью ~0,001 г, экстрагируют смесью этанол — хлороформ — вода (примерно 40 см³) в соотношении 2:1:0,8 в колбе с притертой пробкой на аппарате для встряхивания (или гомогенизируют на гомогенизаторе с числом оборотов не менее 4000 об/мин.). По истечении 10 минут добавляют хлороформ до соотношения указанных компонентов 2:2:0,8. После непрерывного перемешивания в течение 5 минут вводят водный раствор ацетата цинка (20 г/дм³) до соотношения компонентов 2:2:1,8 и вновь перемешивают в течение 30 с (ацетат цинка обеспечивает лучшее разделение водно-спиртового и хлороформного слоев).

Раствор отфильтровывают в делительную воронку через стеклянный пористый фильтр №4 со шлифом, снабженный отводом для подсоединения к вакуум-насосу. Осадок на фильтре промывают 4...5 раз хлороформом (~20 см³). После полного разделения смеси нижний хлороформный слой отделяют от водно-спиртового. Хлороформный фильтрат сливают в мерную колбу и доводят до метки хлороформом. Часть хлороформного экстракта (50 см³) отбирают в предварительно высушенную до постоянной массы и взвешенную колбу со шлифом. Хлороформ удаляют на ротационном испарителе или методом простой перегонки из колбы Вюрца при слабом разрежении и температуре 40...50°C. Остаток, содержащий липиды, высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Для определения массы нелипидных компонентов в колбу с липидами приливают 10 см³ хлороформа и через 5 минут хлороформ аккуратно декантируют. Операцию повторяют трижды. Колбу с нелипидными компонентами подсушивают в сушильном шкафу 5...10 минут, охлаждают и взвешивают. Содержание липидов находят по разности значений масс липидов и нелипидных компонентов.

Массовую долю липидов X (%) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(M_1 - M_2) \cdot 100 \cdot V}{M \cdot V_1},$$

где M — масса исследуемого образца, г; M_1 — масса липидов в 50 см³ экстракта, г; M_2 — масса нелипидных компонентов, г; V — общий объем экстракта, см³; V_1 — объем экстракта, взятый для анализа (50 см³).

3.1.3. Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов с использованием фильтрующей делительной воронки

Реактивы и материалы:

- ♦ Пищевое сырье, продукты его переработки: зерно пшеницы, отруби пшеничные, овсяные.
- ♦ Хлороформ.
- ♦ 96 %-ный этанол.

Методика проведения анализа. Навеску продукта массой 2,00 г из стаканчика для взвешивания переносят в фильтрующую делительную воронку, равномерно смачивают 5 см³ этанола, используя стеклянную палочку, и оставляют на 10 минут. Затем добавляют 10 см³ 96 %-ного

этанола, еще через 2 минуты 20 см³ экстрагирующей смеси хлороформ — этанол в соотношении 2:1. Воронку закрывают притертой пробкой и встряхивают в течение 1...2 минут, многократно переворачивая воронку. Для выравнивания давления внутри воронки необходимо периодически открывать кран или пробку. Полученный экстракт липидов с помощью водоструйного насоса отсасывают в присоединенный к воронке приемник. Перед началом работы в приемник помещают 2...3 см³ экстрагирующей смеси для предотвращения потерь. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя по 20 см³ экстрагирующей смеси. Полученные экстракты объединяют и переносят в сухую, предварительно взвешенную круглодонную колбу вместимостью 100 см³, собирают прибор для прямой перегонки и отгоняют растворитель на водяной бане при слабом вакууме.

После удаления растворителя колбу с липидами помещают в сушильный шкаф, высушивают при температуре ~105°C до постоянной массы, охлаждают в эксикаторе и взвешивают до третьего десятичного знака.

Массовую долю свободных липидов (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(M_2 - M_1) \cdot 100}{M}, \quad (3.1)$$

где M — масса испытуемой пробы, г; M_1 — масса пустой колбы, г; M_2 — масса колбы с липидами, г.

3.1.4. Определение массовой доли «свободных» липидов методом экстракции на аппарате Сокслета

Аппарат Сокслета используют для извлечения различных веществ растворителями (эфир, гексан и др.). Метод с использованием аппарата Сокслета дает достоверные результаты, в том числе и при анализе объектов с небольшим содержанием жиров.

Реактивы и материалы:

- ♦ Образец маргарина, спреда или липидсодержащего объекта.
- ♦ Гексан.
- ♦ Сульфат натрия — прокаленный.

Методика проведения анализа. В фарфоровую ступку взвешивают 5 г испытуемой пробы (маргарина, спреда) с погрешностью до четвертого десятичного знака, смешивают с 15 г прокаленного сульфата натрия в подготовленный патрон из обезжиренной фильтровальной бумаги. Ступку и шпатель протирают несколько раз ватой, сначала

сухой, затем смоченной гексаном. Всю вату помещают в тот же патрон. Сверху закрывают кусочком обезжиренной ваты, края патрона заворачивают. Патрон с навеской, содержащей липиды или жировые продукты, помещают в экстрактор аппарата Сокслета, соединенный с обратным водяным холодильником (рис. 3.2).

Чистую, высушенную и предварительно взвешенную с погрешностью $\sim 0,0001$ г колбу аппарата Сокслета присоединяют к экстрактору.

Через холодильник при помощи воронки наливают в экстрактор гексан таким образом, чтобы патрон был полностью покрыт растворителем. Затем приемную колбу наполняют примерно на $\frac{1}{3}$ объема гексаном. Колбу нагревают на водяной или песчаной бане. Экстракцию проводят в течение 2...3 часов до полной экстракции материала.

Экстракция считается законченной, если на часовом стекле не остается маслянистого пятна от нескольких капель растворителя, снятого с нижней части сифона.

После окончания экстракции патрон вынимают из экстрактора и отгоняют в экстрактор растворитель до полного его испарения. После удаления растворителя колбу с липидами помещают в сушильный шкаф, высушивают при температуре $\sim 105^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Массовую долю свободных липидов в процентах вычисляют по формуле (3.1).

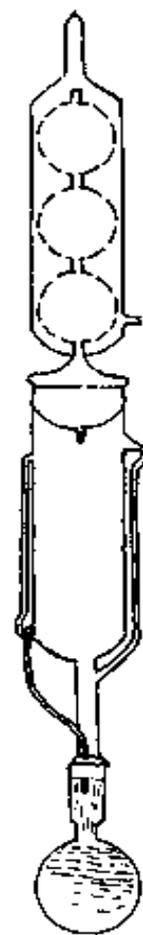


Рис. 3.2. Аппарат Сокслета

3.2. АНАЛИЗ ГРУППОВОГО И ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ

Пищевые жиры и масла, а также выделенные из природных и пищевых объектов липиды, состоят в основном из триацилглицеринов (триглицеридов) различного состава, строения, степени неопределенности и небольшого количества сопутствующих веществ, молекулярно- и коллоидно-растворимых в глицеридах.

Пищевая ценность жиров и продуктов, полученных на их основе, зависит от жирнокислотного и глицеридного состава жира и наличия

в нем комплекса физиологически активных веществ, таких как фосфолипиды, жирорастворимые витамины, каротиноиды и др.

Высока физиологическая ценность высоконепредельных эссенциальных жирных кислот, входящих в состав ацилглицеринов: линолевой, линоленовой и арахидоновой. Олеиновая кислота не обладает физиологической активностью, она является синергистом по отношению к линолевой кислоте.

Количество сопутствующих веществ невелико, но они влияют на качество жиров и масел и на их технологические свойства.

Химический состав липидов, выделенных из пищевого продукта, исследуется по схеме, представленной на рис. 3.1.

В каждом конкретном случае выбирается тот набор анализов, который позволяет получить интересующую исследователя информацию. Наиболее трудоемкой частью является разделение липидов на отдельные группы. На всех стадиях анализа широко используются хроматографические методы разделения.

Хроматография является одним из наиболее эффективных и универсальных физико-химических методов разделения и количественного анализа сложных смесей веществ, в частности липидов.

Все хроматографические методы основаны на различном распределении веществ между двумя несмешивающимися фазами. Одна из фаз неподвижная, другая — подвижная, непрерывно фильтруется через нее.

Роль неподвижной фазы могут выполнять твердые тела или жидкости, нанесенные в виде пленки на частицы инертных твердых тел. В качестве подвижной фазы используют жидкость или газ.

Простейшая классификация видов хроматографии составлена в соответствии с выбранным типом подвижной или неподвижной фазы (рис. 3.3).

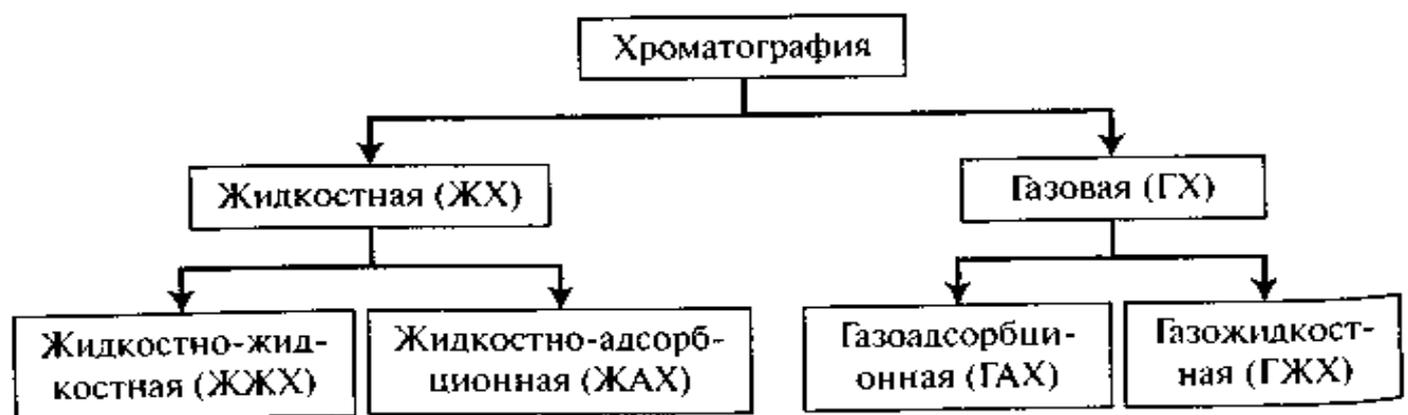


Рис. 3.3. Классификация видов хроматографии

Хроматографические методы анализа позволили значительно расширить исследования во всех областях липидологии.

3.3. АНАЛИЗ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЖИРОВ И МАСЕЛ

3.3.1. Определение температуры плавления

Температурой плавления жира называется температура, при которой жир переходит из твердого состояния в жидкое. Поскольку натуральные жиры представляют собой смеси триацилглицеринов, имеющие различные температуры плавления, переход их в жидкое состояние происходит в пределах некоторого интервала температур.

Температуры плавления зависят от специфических особенностей ацилглицеринов и от их жирнокислотного состава. У насыщенных жирных кислот температура плавления возрастает с увеличением молекулярной массы. У ненасыщенных жирных кислот на температуру плавления оказывают влияние наличие двойных связей, их положение в углеродной цепи и стереоконфигурация молекулы (цис- или транс-изомеры).

Реактивы и материалы:

- ♦ Пальмовое масло.
- ♦ Масло какао.
- ♦ Кондитерский жир.

Методика проведения анализа. Небольшое количество исследуемого образца жира нагревают в фарфоровой чашке на водяной бане до полного расплавления. Сухой, открытый с двух концов капилляр из тонкого стекла с внутренним диаметром 1,0...1,2 мм и длиной 50...60 мм погружают одним концом в расплавленный жир так, чтобы высота его в капилляре была равна 10 мм (заполняют подобным образом 2 капилляра). Капилляр с жиром выдерживают на льду в течение 1 часа. После этого капилляр прикрепляют к термометру с помощью тонкого резинового кольца таким образом, чтобы столбик жира находился на одном уровне с ртутным шариком термометра. Затем термометр осторожно опускают в стакан с водой (~100 см³), имеющей температуру 15...18 °С на такую глубину, чтобы он был погружен в воду на 3...4 см. При непрерывном перемешивании воду в стакане нагревают со скоростью 1...2 °С в минуту. Фиксируют температуру, при которой жир в капилляре начи-

нает подниматься. Определение проводят 2 раза, за результат принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений, которые не должны различаться более чем на $0,5^{\circ}\text{C}$.

3.3.2. Определение кислотного числа

Кислотное число (КЧ) — количество мг КОН, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. Кислотное число зависит от качества жира, способа его получения, условий хранения и других факторов. Кислотное число относится к регламентируемым ГОСТом показателям: для нерафинированных масел кислотное число допускается до 6 мг КОН.

Реактивы и материалы:

- ♦ образцы жиров и масел;
- ♦ 96 %-ный этиловый спирт;
- ♦ 0,1 моль/дм³ спиртовой раствор КОН;
- ♦ 1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Методика проведения анализа. В конической колбе взвешивают 3...5 г образца жира с погрешностью не более 0,01 г, приливают отмеренные цилиндром 50 см³ предварительно приготовленной нейтральной смеси диэтилового эфира и 96 %-ного этилового спирта (2 : 1), перемешивают до растворения навески образца и приливают несколько капель раствора фенолфталеина. Полученный раствор при постоянном перемешивании титруют из микробюретки 0,1 моль/дм³ спиртовым раствором КОН до слабо-розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

Кислотное число (мг КОН на 1 г жира) вычисляют по формуле:

$$\text{КЧ} = \frac{5,611 \cdot KV}{m},$$

где K — поправка к титру; 5,611 — титр 0,1 моль/дм³ раствора КОН, мг/см³; V — количество см³ 0,1 моль/дм³ раствора КОН, затраченное на титрование; m — навеска образца масла, в г.

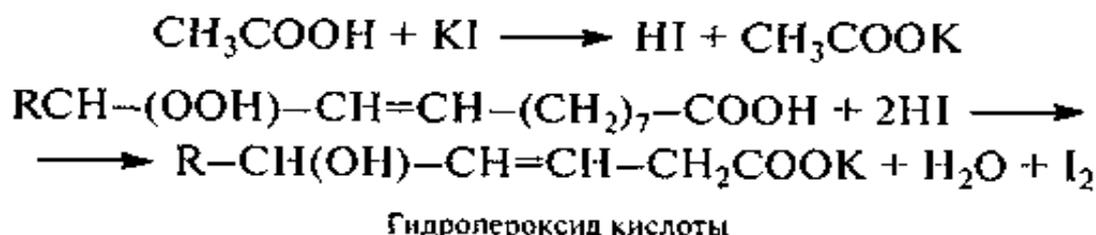
Определение проводят в двух повторностях. Расхождение между двумя параллельными определениями не более 0,06 мг КОН.

Пользуясь коэффициентом пересчета на олеиновую кислоту (для подсолнечного, соевого масел и кондитерского жира) и пальмитиновую кислоту (для пальмового масла), равными 0,503 и 0,456 соответственно, определяют примерное свободных жирных кислот в % в исследуемых образцах жиров.

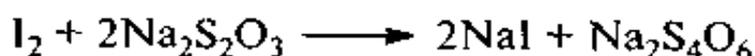
3.3.3. Определение перекисного числа

Перекисное число (ПЧ) выражают в миллимолях активного кислорода на 1000 г жира или процентах йода, выделившегося при взаимодействии активного пероксидного или гидропероксидного кислорода с йодистоводородной кислотой.

Метод основан на реакции взаимодействия активного пероксидного или гидропероксидного кислорода с йодистоводородной кислотой при титровании:



Выделившийся свободный йод оттитровывают тиосульфатом натрия:



Метод предназначен для определения первичных продуктов окисления жиров и масел — пероксидных и гидропероксидных соединений.

Реактивы и материалы:

- ♦ Хлороформ х. ч.
- ♦ Ледяная уксусная кислота.
- ♦ 50 %-ный водный свежеприготовленный йодистый калий.
- ♦ 0,01 моль/дм³ раствор тиосульфата натрия.
- ♦ 1 %-ный раствор свежеприготовленного крахмального клейстера (0,25 г растворимого крахмала смешивают с 5 см³ воды и добавляют эту смесь к 20 см³ кипящей воды, кипятят 2...3 минуты).

Методика проведения анализа. В коническую колбу с пришлифованной крышкой взвешивают с точностью до третьего десятичного знака 1 г исследуемого масла (жира). Навеску масла (жира) растворяют в предварительно приготовленной смеси ледяной уксусной кислоты и хлороформа (в соотношении 2:1 по объему). Добавляют в колбу 1 см³ 50 %-ного раствора KI (не должно быть расслоения, в противном случае необходимо увеличить количество смеси). Колбу выдерживают 20 минут без доступа света. Затем в колбу добавляют 50 см³ дистиллированной воды и 5...6 капель 1 %-ного раствора крахмального клейстера. Выделенный йод титруют 0,01 моль/дм³ раствором тиосульфата натрия. Параллельно с основным определением проводят контрольное определение.

Перекисное число в миллимолях активного кислорода на кг вычисляют по формуле:

$$\text{ПЧ} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot C \cdot 1000}{m},$$

где V_1 — количество 0,01 моль/дм³ раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование в основном опыте, см³; V_2 — количество 0,01 моль/дм³ раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование в контрольном опыте, см³; C — концентрация раствора тиосульфата натрия, моль/дм³; m — масса исследуемого образца масла или жира, г; 1000 — коэффициент, учитывающий пересчет результата измерения в миллимоли на кг.

3.4. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 3.4.1

Определение массовой доли «свободных» липидов в различных пищевых объектах

Цель работы. Выделение «свободных» липидов методом исчерпывающей экстракции на аппарате для встряхивания (качалке) из муки, хлебобулочных и макаронных изделий и выделение липидов методом экстракции на аппарате Сокслета из маргарина, спреда, кондитерского жира. Определение количественного содержания липидов.

Реактивы и материалы:

- ♦ Пищевые продукты: мука, хлеб, макаронные изделия; маргарин, спред, кулинарный жир.
- ♦ Гексан.
- ♦ Сульфат натрия — прокаленный.

1. Выделение «свободных» липидов методом исчерпывающей экстракции на аппарате для встряхивания

Методика проведения анализа. Навеску измельченного продукта массой 4 г помещают в стеклянную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 см³. В колбу приливают 40 см³ гексана, закрывают колбу притертой пробкой и интенсивно встряхивают на качалке в течение 30 мин. По истечении указанного времени полученный экстракт фильтруют через складчатый фильтр на конической воронке. Экстракцию повторяют трижды.

Отфильтрованный экстракт переносят в сухую, предварительно взвешенную круглодонную колбу вместимостью 100 см³, собирают прибор для прямой перегонки и отгоняют растворитель на водяной бане при слабом вакууме. Затем колбу с липидами высушивают в вакуум-сушильном шкафу при температуре не выше 50 °С в течение 50 мин.

Колбу взвешивают и определяют количество липидов в пробе. Полученные данные вносят в таблицу (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Количество «свободных» липидов, измеренное на аппарате для встряхивания

Наименование образца	Масса, г			Количество липидов	
	образца	пустой колбы	колбы с липидами	г	%
Мука					
Хлеб					
Макаронные изделия					

На основании полученных результатов проводят сравнительную оценку массовой доли липидов в исследуемых пищевых объектах.

2. Определение массовой доли «свободных» липидов методом экстракции на аппарате Сокслета

Методика проведения анализа. Выделение липидов проводят методом экстракции на аппарате Сокслета и определяют массовую долю свободных липидов согласно методике, описанной в п. 3.1.3, с. 93.

Полученные данные вносят в таблицу (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Количество «свободных» липидов, измеренное на на аппарате Сокслета

Наименование образца	Масса, г			Количество липидов	
	образца	пустой колбы	колбы с липидами	г	%
Маргарин					
Спред					
Кулинарный жир					

На основании результатов исследований делают выводы о массовой доле липидов в анализируемых объектах.

Лабораторная работа 3.4.2

Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов в растительном сырье и продуктах его переработки

Цель работы. Выделение «общих» (суммарных) липидов из пищевого сырья и продуктов его переработки и определение количественного содержания липидов.

Реактивы и материалы:

- ♦ Пищевое сырье и пищевые продукты: бобы сои, соевая мука, продукты из сои, зерно пшеницы, пшеничные и овсяные отруби.
- ♦ 96 %-ный этанол.
- ♦ Хлороформ.

Методика проведения анализа.

1. Определение массовой доли суммарных липидов проводят методом экстракции по Блайя — Дайеру, как описано в п. 3.1.2, с. 92.

Результаты анализа вносят в таблицу (табл. 3.3).

Таблица 3.3

Определение массовой доли суммарных липидов методом экстракции по Блайя

Образец	Масса, г			Объем экстракта, см ³		Массовая доля липидов, %
	исследуемого образца (M)	липидов в 50 см ³ экстракта (M_1)	нелипидных компонентов (M_2)	Общий объем (V)	Объем, взятый для анализа (V_1)	
Бобы сои						
Соевая мука						
Продукты из сои						

На основании полученных данных проводят сравнительную оценку содержания липидов в исследуемых пищевых объектах

2. Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов с использованием фильтрующей делительной воронки проводят согласно методике, описанной в п. 3.1.3, с. 93.

Полученные данные вносят в таблицу (табл. 3.4).

На основании результатов исследований делают выводы о массовой доле липидов в анализируемых объектах.

Определение массовой доли «общих» липидов с использованием фильтрующей делительной воронки

Наименование образца	Масса, г			Количество липидов	
	образца	пустой колбы	колбы с липидами	г	%
Зерно пшеницы					
Отруби пшеничные					
Отруби овсяные					

Лабораторная работа 3.4.3

**Экстракция липидов из пищевого объекта
и определение их группового состава**

Цель работы: выделение липидов методом экстракции из конкретного пищевого объекта, определение количественного содержания липидов в объекте и анализ группового состава липидов.

Реактивы и материалы:

- ♦ Пищевое сырье и пищевые продукты.
- ♦ Гексан.
- ♦ Хлороформ.
- ♦ Диэтиловый эфир.
- ♦ Уксусная кислота ледяная.
- ♦ 5 %-ный раствор фосфорно-молибденовой кислоты в этаноле.
- ♦ Хроматографические пластины «Силуфол».

1. Экстракция липидов из пищевого объекта (муки, крупы, хлебобулочных и макаронных изделий)

Методика выполнения анализа. Навеску измельченного продукта массой 4 г помещают в стеклянную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 см³. В колбу приливают 40 см³ гексана, закрывают колбу притертой пробкой и интенсивно встряхивают на качалке в течение 30 мин. По истечении указанного времени полученный экстракт фильтруют через складчатый фильтр на конической воронке.

Отфильтрованный экстракт переносят в сухую, предварительно взвешенную круглодонную колбу вместимостью 100 см³, собирают

прибор для прямой перегонки и отгоняют растворитель на водяной бане при температуре $\sim 80^\circ\text{C}$ до полного испарения гексана. Затем колбу с липидами высушивают в вакуум-сушильном шкафу при температуре не выше 70°C в течение 50 мин.

Колбу взвешивают и определяют количество липидов в пробе.

Полученные данные вносят в таблицу (табл. 3.5).

Таблица 3.5

Результаты экстракции липидов из пищевого объекта

Наименование образца	Масса, г			Количество липидов	
	образца	пустой колбы	колбы с липидами	г	%
Зерно					
Мука					
Хлеб					
Макаронные изделия					

2. Определение группового состава липидов

Извлекаемая растворителями из пищевого объекта смесь, состоящая из различных групп липидов и растворенных в них сопутствующих веществ, условно называется сырым жиром. Сырой жир включает три-, ди- и моноацилглицерины, свободные жирные кислоты, стерины, фосфолипиды, жирорастворимые пигменты, жирорастворимые витамины, воски, углеводороды и другие группы или фракции липидов. Для анализа качественного и количественного группового (фракционного) состава липидов часто применяют метод тонкослойной хроматографии на пластинах «Силуфол».

Методика проведения анализа. Выделенные из пищевого объекта липиды растворяют в хлороформе до получения 2 %-ного раствора.

Пластинки «Силуфол» предварительно окрашивают фосфорномолибденовой кислотой, опуская их в 5 %-ный раствор кислоты в этаноле, и затем высушивают на воздухе.

На подготовленную пластину «Силуфол» с помощью микрошприца наносят 1 мкл (10^{-6} см^3) 2 %-ного раствора липидов в хлороформе в виде сплошной узкой полосы длиной до 7 мм на линию старта. Линию старта предварительно намечают на расстоянии ~ 10 мм от нижнего и боковых краев пластины.

Разделение проводят в стеклянной камере с пришлифованной крышкой. Камеру заполняют системой растворителей до высоты не

более 5 мм для того, чтобы растворитель не касался стартовой линии пластины. Пластину с нанесенными образцами липидов помещают в камеру, вертикально погружая в разделительную смесь, и оставляют в ней до тех пор, пока высота подъема фронта растворителя не достигнет отмеченной длины разделительного пути. Разделительный путь (расстояние от линии старта до линии фронта растворителя) равен для пластины «Силуфол» ~90 мм.

Разделение проводят в системе растворителей гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота в соотношении 80 : 20 : 1. После окончания хроматографического разделения пластину вынимают из камеры и сушат в горизонтальном положении до полного испарения остатков растворителей.

Проявление пластин проводят в термостате в течение 5...10 минут при температуре 60 °С. Идентификацию фракций проводят с помощью стандартных веществ-свидетелей или по значению R_f для данной системы растворителей.

Результаты идентификации приводят в таблице (табл. 3.6).

Таблица 3.6

Идентификация группового состава липидов исследуемых образцов

№ п/п	Группы липидов	Значение R_f			
		по литературным данным	исследуемых образцов липидов		
			Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	Полярные липиды (глико- и фосфолипиды)	На старте			
2	Моноацилглицерины	0,02			
3	1,2-диацилглицерины; 1,3-диацилглицерины	0,13...0,21			
4	Свободные жирные кислоты	0,39			
5	Триацилглицерины	0,60			
6	Эфиры стероидов, углеводороды	0,94			

Количественную оценку группового состава липидов осуществляют на специальном приборе — денситометре, позволяющем получить результат измерений в виде графической записи (денситограммы).

При расчете концентраций компонентов исследуемой смеси используют метод внутренней нормализации.

Концентрация каждого компонента смеси в относительных процентах вычисляется по формуле:

$$C_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \cdot 100\%,$$

где S_i — геометрическая площадь соответствующего пика на денситограмме.

Результаты вычислений приводят в таблице (табл. 3.7).

Таблица 3.7

Количественный групповой состав липидов (по данным денситограмм)

№ п/п	Группы липидов	Относительное содержание групп липидов в исследуемых образцах, %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	Полярные липиды (глико- и фосфолипиды)			
2	Моноацилглицерины			
3	1,2-диацилглицерины; 1,3-диацилглицерины			
4	Свободные жирные кислоты			
5	Триацилглицерины			
6	Эфиры стерина, углеводороды			

На основании результатов работы делают выводы о содержании липидов в исследуемых пищевых объектах, групповом составе липидов и относительном содержании отдельных групп липидов.

Лабораторная работа 3.4.4

Анализ группового и жирнокислотного состава пищевых жиров и масел

Изучение группового и жирнокислотного состава пищевых жиров и масел является одним из основных компонентов комплексного анализа липидов, поскольку характеризует как технологические свойства жиров и продуктов, полученных на их основе, так и их пищевую ценность.

Цель работы: с помощью методов тонкослойной и газожидкостной хроматографии провести сравнительный анализ пищевых масел и жиров и выявить отличия в их групповом (фракционном) и жирнокислотном составе.

Реактивы и материалы:

♦ Пищевые масла и жиры (подсолнечное, пальмовое масла, какао-масло, кондитерский жир, саломасы различных марок).

- ♦ Этанол.
- ♦ Ацетилхлорид.
- ♦ Хлороформ.
- ♦ Гексан.
- ♦ Диэтиловый эфир.
- ♦ Уксусная кислота ледяная.
- ♦ 5 %-ный раствор фосфорно-молибденовой кислоты в этаноле.
- ♦ Хроматографические пластины «Силуфол».

1. Определение группового состава пищевых жиров и масел

Методика проведения анализа. Анализ группового состава пищевых жиров и масел выполняется в соответствии с методикой, приведенной на с. 104.

Результаты анализа группового состава исследуемых образцов пищевых жиров и масел приводят в таблице (табл. 3.8).

Таблица 3.8

Групповой состав исследуемых образцов пищевых жиров и масел

№ п/п	Группы липидов	Относительное содержание групп липидов в исследуемых образцах, %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	Полярные липиды (глико- и фосфолипиды)			
2	Моноацилглицерины			
3	1,2-диацилглицерины; 1,3-диацилглицерины			
4	Свободные жирные кислоты			
5	Триацилглицерины			
6	Эфиры стеринов, углеводороды			

2. Определение жирнокислотного состава пищевых жиров и масел методом газожидкостной хроматографии

При исследовании состава жирных кислот липидов разделению на хроматографической колонке газового хроматографа подвергают их метиловые или этиловые эфиры, которые получают перэтерификацией липидов и метилированием (этилированием) жирных кислот.

Методика выполнения анализа. Для получения эфиров жирных кислот в круглодонной колбе вместимостью 100 см³ взвешивают 50 мг исследуемых пищевых жиров или масел, растворяют в 10 см³ хлоро-

форма, добавляют в колбу 10 см³ спирта и 0,1 см³ ацетилхлорида (работать под тягой!). Колбу присоединяют к обратному холодильнику и реакционную массу нагревают в течение 1 часа на слабом пламени горелки. По истечении этого времени горелку отключают, реакционную массу охлаждают, переносят в делительную воронку, добавляют 20 см³ хлороформа и 10 см³ дистиллированной воды. Нижний хлороформенный раствор собирают в круглодонную колбу и удаляют хлороформ на приборе для простой перегонки при температуре водяной бани ~70 °С.

Полученные эфиры жирных кислот разбавляют 1 см³ гексана и 1 мкл (10⁻⁶ см³) полученного раствора вводят в газовый хроматограф. Результаты анализа фиксируются на записывающем приборе в виде хроматограмм.

Число пиков на хроматограмме соответствует числу высокомолекулярных жирных кислот в исследуемом образце пищевого масла или жира.

Расчет хроматограмм осуществляется методом внутренней нормализации, при котором концентрацию компонентов C_i анализируемой смеси рассчитывают по формуле:

$$C_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \cdot 100\%,$$

где S_i — геометрическая площадь соответствующего пика.

После расчета хроматограмм составляют таблицу (табл. 3.9) для сравнения жирнокислотного состава исследуемых образцов пищевых жиров и масел.

Таблица 3.9

Жирнокислотный состав исследуемых образцов пищевых жиров и масел

№ п/п	Жирная кислота		Относительное содержание, %			
	Условное обозначение	Название		Образец 1	Образец 2	Образец 3
		тривиальное	систематическое			
1	C _{12:0}	Лауриновая	Додекановая			
2	C _{14:0}	Миристиновая	Тетрадекановая			
3	C _{16:0}	Пальмитиновая	Гексадекановая			
4	C _{18:0}	Стеариновая	Октадекановая			
5	C _{18:1} (9-цис)	Олеиновая	9-цис-Октадеценная			
6	C _{18:1} (9-транс)	Элаидиновая	9-транс-Октадеценная			

Таблица 3.9 (продолжение)

Жирнокислотный состав исследуемых образцов пищевых жиров и масел

№ п/п	Жирная кислота		Относительное содержание, %			
	Условное обозначение	Название		Образец 1	Образец 2	Образец 3
		тривиальное	систематическое			
7	$C_{18:2}$ (9-цис, 12-цис)	Линолевая (ω -6)	9- цис, 12- цис-Октадекадиеновая			
8	$C_{18:3}$ (9-цис, 12-цис, 15-цис)	Линоленовая (ω -3)	9- цис, 12-цис, 15- цис-Октадекатриеновая			
9	$C_{20:0}$	Арахидовая	Эйкозановая			
10	$C_{22:1}$ (13-цис)	Эруковая	13-цис-Докозеновая			

После окончания работы проводят сравнительную оценку группового и жирнокислотного состава пищевых жиров и масел. В выводах подчеркивают выявленные отличия.

Лабораторная работа 3.4.5

Определение физико-химических показателей качества жиров и масел

Для характеристики качества и природы жиров и масел используют комплекс физических и химических показателей.

Цель работы: определение физико-химических показателей пищевых жиров — температуры плавления, кислотного и перекисного чисел жиров и масел; анализ качества исследуемых жировых продуктов.

Реактивы и материалы:

- Пищевые масла и жиры (подсолнечное, пальмовое масла, какао-масло, кондитерский жир и др.).
- Реактивы для определения кислотного и перекисного чисел.

Методика проведения анализа. Определение температуры плавления, кислотного и перекисного чисел жиров и масел исследуемых жировых продуктов проводят согласно методикам, приведенным в пп. 3.3.1...3.3.3, с. 97.

Результаты определений приводят в таблице (табл. 3.10).

На основании полученных результатов делают выводы о качестве пищевых жиров.

Таблица 3.10

Физико-химические показатели пищевых жиров

№ образца	Наименование образца	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	Кислотное число (КЧ)				Перекисное число (ПЧ)				
			$m, \text{г}$	$V, \text{см}^3$	K	КЧ	$m, \text{г}$	$V_{\text{I}_2}, \text{см}^3$	$V_{\text{O}_2}, \text{см}^3$	$C, \text{моль/дм}^3$	ПЧ
1											
2											
3											

Контрольные вопросы

1. Что такое липиды? Какую роль выполняют липиды в живой клетке?
2. Какие виды условной классификации липидов вам известны?
3. Какие группы липидов относятся к простым липидам?
4. В чем состоит отличие простых липидов от сложных?
5. Приведите формулы и названия эссенциальных жирных кислот, их роль в питании человека.
6. Какие физико-химические характеристики жиров вам известны? Какие процессы можно контролировать с помощью кислотного числа?

МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Минеральные вещества являются незаменимыми микронутриентом питания и должны ежедневно потребляться с пищей. В зависимости от количества минеральных веществ в организме человека и пищевых продуктах их подразделяют на макро- и микроэлементы. К макроэлементам относят калий, натрий, кальций, магний, фосфор, хлор и серу. Они содержатся в количествах, измеряемых сотнями и десятками миллиграммов на 100 г тканей или пищевого продукта. Содержание микроэлементов выражается десятими, сотыми и тысячными долями миллиграмма. К наиболее значимым микроэлементам можно отнести железо, йод, фтор, селен и др. Некоторые микроэлементы, например свинец, кадмий, ртуть, цинк, относятся к токсичным элементам и в концентрациях, превышающих предельно-допустимые (ПДК), могут вызывать тяжелые отравления.

Роль минеральных веществ в организме человека чрезвычайно разнообразна: они содержатся в протоплазме и биологических жидкостях, обеспечивают постоянство осмотического давления, входят в состав сложных органических соединений (гемоглобина, гормонов, ферментов), являются пластическим материалом для построения костной и зубной тканей, участвуют в передаче нервных импульсов, обеспечивают свертывание крови и другие физиологические процессы организма.

При переработке пищевого сырья, как правило, происходит снижение содержания минеральных веществ, исключением является только добавление пищевой соли. В растительных продуктах они теряются при механической обработке. Так, содержание ряда макро- и особенно микроэлементов при получении крупы и муки при обработке зерна уменьшается, так как в удаляемых оболочках и зародышах этих компонентов находится больше, чем в целом зерне.

Применение методов кулинарной обработки пищевых продуктов, также приводит к потере минеральных веществ, например при размораживании (в горячей воде) мяса, рыбы, при отваривании продуктов и

удалении бульонов и отваров, так как в них переходит значительное количество растворимых солей.

Для определения содержания минеральных веществ используют химические, физико-химические методы анализа — оптические и электрохимические. Классификация и краткая характеристика методов представлена на схеме (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Классификация методов анализа минеральных веществ

Практически все эти методы требуют особой подготовки проб для анализа, которая заключается в предварительной минерализации объекта исследования, которую можно проводить двумя способами — «сухим» и «мокрым». «Сухая» минерализация предполагает проведение при определенных условиях обугливания, сжигания и прокаливания пробы. «Мокрая» минерализация предусматривает еще и обработку проб концентрированными неорганическими кислотами.

4.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

4.1.1. Определение зольности

Определение общего содержания золы основано на сжигании материала и последующем количественном определении остатка.

Реактивы и материалы:

- ♦ Уксуснокислый магний в 95 %-ном этаноле (1,61 г уксуснокислого магния в 100 см³ этанола с несколькими кристаллами йода: 1 см³ этого раствора после прокаливания образует 3 мг окиси магния).
- ♦ 30 %-ный H₂O₂.
- ♦ Азотная кислота ($\rho = 1,40$).

Методика проведения анализа. В прокаленные и взвешенные тигли помещают навеску 1,0...5,0 г измельченного материала (величина навески зависит от содержания золы). Затем каждую навеску смачивают 1...2 см³ этилового спирта, тигли ставят на электроплитку в вытяжном шкафу и спичкой зажигают смоченные спиртом навески. После того как спирт выгорит, материал продолжают сжигать на электроплитке. Когда тигли перестанут дымить и навески обуглятся (примерно 30 минут), поступают одним из следующих способов:

1. В каждый тигель прибавляют 5...8 капель концентрированной азотной кислоты или столько же капель 30 %-ного пероксида водорода, или столько же капель 10 %-ного раствора азотнокислого аммония. Тигли ставят в слабо нагретый муфель (100 °С) для выпаривания окислителей. Затем температуру муфеля постепенно увеличивают до красного каления, что соответствует 600...650 °С; при этой температуре озоление продолжают еще 30...40 минут.

2. В каждый тигель прибавляют по 2 или 3 см³ раствора уксуснокислого магния в спирте, перемешивают и дают пропитаться, затем помещают в слабо нагретый и постепенно увеличивают температуру. Для озоления достаточно однократного прибавления катализатора и нагревания в течение 45...60 минут. Полученная зола в зависимости от анализируемого материала может иметь разнообразные цвета и оттенки.

После этого тигли вынимают из муфеля и ставят в эксикатор для охлаждения, после чего взвешивают с точностью до 0,5 мг.

Для вычисления процента золы вычитают внесенное количество магния в пересчете на оксид. Титр этих растворов устанавливают весовым методом. Для этого в заранее прокаленный и взвешенный тигель наливают 5 см³ приготовленного раствора, выпаривают, прокаливают

и подсчитывают, какое количество окиси магния содержится в 1 см^3 приготовленного раствора.

Процентное содержание золы пересчитывают на сухое вещество, если материал не был предварительно доведен до сухого состояния.

4.1.2. Определение натрия и калия методом ионометрии

Метод основан на измерении потенциала ионоселективного электрода с натриевой или калиевой функцией.

Реактивы и материалы:

- Хлорид натрия 0,1 М раствор.
- Хлорид калия 0,1 М раствор.
- Сульфат аммония 2 М раствор.
- рН-метр — милливольтметр.
- Ионоселективные электроды.
- Электрод сравнения — хлорсеребряный электрод ЭВЛ-1МЗ.

Построение градуировочного графика. Для построения градуировочного графика необходимо приготовить восемь стандартных растворов (табл. 4.1).

Таблица 4.1

Приготовление стандартных растворов для градуировочного графика

№ колбы	С, моль/дм ³	Способ приготовления раствора в колбах вместимостью 200 см ³
1	10^{-1}	Исходный раствор
2	$5 \cdot 10^{-2}$	100 см ³ раствора 1 + 2 см ³ 2 М раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, разбавляют водой до метки
3	10^{-2}	20 см ³ раствора 1 + 2 см ³ 2 М раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, вода до метки
4	$5 \cdot 10^{-3}$	20 см ³ раствора 2 + 2 см ³ 2 М раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, вода до метки
5	10^{-3}	20 см ³ раствора 3 + 2 см ³ 2 М раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, вода до метки
6	$5 \cdot 10^{-4}$	20 см ³ раствора 4 + 2 см ³ раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, вода до метки
7	10^{-4}	20 см ³ раствора 5 + 2 см ³ раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, вода до метки
8	$5 \cdot 10^{-5}$	20 см ³ раствора 6 + 2 см ³ раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, вода до метки

2 М раствора сульфата аммония используют в качестве постороннего индифферентного электролита.

В зависимости от применяемого для анализа электрода, используют в качестве исходных растворы солей, содержащих определяемый

ион, с концентрацией 0,1 М (для Na^+ — раствор хлорида натрия, для K^+ — хлорид калия).

В стаканчик для определения последовательно наливают, переходя от меньших концентраций к большим, по 30...50 см³ приготовленного стандартного раствора. В каждом из этих растворов проводят измерения потенциалов индикаторного электрода (не менее трех раз). Полученные результаты вносят в таблицу (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Результаты определения натрия и калия методом ионометрии

Электродный потенциал, мВ	Концентрация стандартных растворов, моль/дм ³							
	10 ⁻¹	5 · 10 ⁻²	10 ⁻²	5 · 10 ⁻³	10 ⁻³	5 · 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	5 · 10 ⁻⁵
	-lg C							
	1	1,3	2	2,3	3	3,3	4	4,3
E_1								
E_2								
E_3								
$E_{\text{ср}}$								

По полученным данным строят градуировочный график $E = f(-\lg C)$, используя средние значения потенциала $E_{\text{ср}}$.

Типичная форма градуировочного графика для натриевого и калиевого электрода представлена на рис. 4.2.

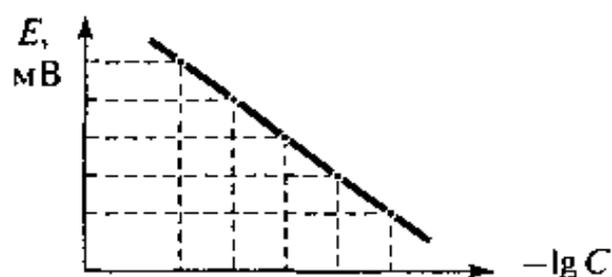


Рис. 4.2. Градуировочный график для натриевого и калиевого электродов

4.1.3. Определение натрия и калия методом пламенной фотометрии

Метод основан на измерении интенсивности излучения, испускаемого возбужденными атомами или молекулами.

Реактивы и материалы:

- Стандартный раствор NaCl 50 мкг/см³.
- Стандартный раствор KCl — 50 мкг/см³.
- Пламенный фотометр.
- Светофильтры интерференционные: для Na^+ $\lambda = 588$ нм, для K^+ $\lambda = 767$ нм.

Построение градуировочного графика. Используя стандартные растворы KCl, NaCl, готовят разбавленные растворы с известной концентрацией для построения градуировочного графика.

Растворы готовят в мерных колбах вместимостью 50 см³ путем разбавления стандартных растворов.

$$T_i \cdot V_k = T_0 \cdot V_0,$$

где T_0 ; T_i — титр стандартного и градуировочных растворов; V_k — объем колбы для приготовления градуировочных растворов; V_0 — необходимый раствор стандартного объема.

Объем колб со стандартными растворами доводят до метки дистиллированной водой.

Используя пламенный фотометр с соответствующими светофильтрами для натрия и калия, измеряют интенсивность спектральных линий для каждого стандартного раствора, начиная с минимальной концентрации. Результаты измерений вносят в таблицу (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Результаты измерения интенсивности спектральных линий для растворов

Ион	Интенсивность излучения	Концентрации, мкг/мл				
		20,0	15,0	10,0	5,0	2,0
Na ⁺	I_1					
	I_2					
	I_3					
	$I_{\text{ср}}$					
K ⁺	I_1					
	I_2					
	I_3					
	$I_{\text{ср}}$					

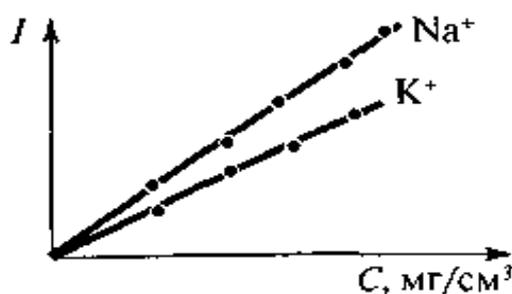


Рис. 4.3. Градуировочный график для определения содержания ионов Na⁺ и K⁺

Измерение интенсивности в каждом стандартном растворе проводят трижды, каждый раз наливая в кювету для измерения новую порцию раствора. Рассчитывают среднее значение интенсивности.

По полученным данным строят график зависимости $I=f(C)$. Типичная форма градуировочного графика представлена на рис. 4.3.

4.1.4. Определение содержания железа методом фотометрии

Метод основан на измерении интенсивности окраски раствора комплексного соединения трехвалентного железа с гексацианоферратом калия $K_4[Fe(CN)_6]$.

Аппаратура, реактивы и материалы:

- ♦ фотоэлектроколориметр КФК-МП или других марок;
- ♦ кюветы, $l = 2$ см, 2 шт;
- ♦ колбы мерные вместимостью 100 мл;
- ♦ пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 мл;
- ♦ фильтры обеззоленные, синяя лента;
- ♦ основной стандартный раствор железа — $0,1$ г/дм³;
- ♦ калий железисто-синеродистый — 10 %-ный раствор;
- ♦ перекись водорода — 30 %-ный раствор;
- ♦ серная кислота — 100 г/л.

Построение градуировочного графика. В семь мерных колб вместимостью 100 см³ вносят 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 см³ основного стандартного раствора железа. В каждую колбу добавляют 5 см³ раствора HCl; одну каплю раствора H₂O₂; 4 см³ раствора $K_4[Fe(CN)_6]$ и доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор сравнения готовят так же, но без добавления раствора железа.

Через 30 минут измеряют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре при длине волны 600 нм (красный светофильтр).

Оптическую плотность каждого раствора измеряют 3 раза и находят $A_{ср}$. Результаты измерений вносят в табл. 4.4.

Таблица 4.4

Данные измерения оптической плотности стандартных растворов

Оптическая плотность A	Концентрация стандартных растворов, мг/дм ³						
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
A_1							
A_2							
A_3							
$A_{ср}$							

По полученным данным строят градуировочный график $A = f(C_{Fe})$.

4.1.5. Метод атомно-абсорбционной спектроскопии

Атомно-абсорбционная спектроскопия представляет собой аналитический метод, основанный на поглощении газообразными атомами ультрафиолетового или видимого излучения. Для того, чтобы перевести образец в газообразное атомарное состояние, раствор образца впрыскивают в пламя. В качестве источника излучения применяют лампу с полым катодом, который содержит определяемый металл.

Обычно каждая лампа, применяемая для атомно-абсорбционного анализа, дает спектр испускания атомов какого-либо одного элемента. Поэтому для определения нескольких элементов в исследуемом образце необходимо иметь набор ламп на различные элементы. Таким образом, определяют несколько элементов при последовательной замене ламп, используя их поочередно в качестве источников возбуждения.

Атомы элемента, находящиеся в пламени, поглощают только то излучение, которое испускает источник света. Интервал длин волн спектральной линии, испускаемый источником света, и линии поглощения того же самого элемента в пламени очень узок, поэтому мешающее поглощение других элементов практически не сказывается на результатах анализа.

При количественных определениях для серии стандартных растворов строят градуировочный график зависимости величины поглощения от концентрации: $I = f(C)$. Измеряют поглощение, которое соответствует оптической плотности или пропусканию, при условии, что первое измерение соответствует 100% пропускания. Оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации поглощающих атомов, поэтому градуировочный график строят в координатах: «оптическая плотность — концентрация определяемого элемента».

4.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 4.2.1

Изучение минерального состава пищевых продуктов

Определение минерального состава растительного продовольственного сырья и пищевых продуктов не должно ограничиваться определением общего содержания зольных элементов, поскольку содер-

жание как макро-, так и микроэлементов, их соотношение, наряду с макронутриентами, может характеризовать пищевую ценность продукта, а также его качество и безопасность.

Цель работы: определение макроэлементов (натрия и калия — метод ионометрии, метод пламенной фотометрии); микроэлементов (железа — метод фотометрии).

Методика проведения анализа.

1. Подготовка проб пищевых продуктов для анализа. На технических весах берут навеску продукта (табл. 4.5), переносят ее в мерную колбу. Объем колбы доводят дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы тщательно перемешивают в течение 1...3 минут. Затем колбу оставляют для осаждения нерастворимой части, после чего надосадочную жидкость (водную вытяжку) аккуратно сливают в коническую колбу и в дальнейшем используют для анализа.

Таблица 4.5

**Примерные навески пищевых продуктов
для приготовления водных вытяжек**

Продукт	Навеска, г	Вместимость мерной колбы, см ³
Хлеб и хлебобулочные изделия	10	100
Зерно и зернопродукты	10	100
Сухие завтраки	10	100
Концентраты:		
супы	5	100
кисели	10	100

Приготовление проб плодоовощной продукции. Образец анализируемого продукта (картофель, морковь, свекла, яблоки и др.) тщательно моют, нарезают на куски и с помощью соковыжималки получают клеточный сок продукта, который затем используют для анализа.

Приготовление проб напитков. Анализ содержания ионов Na^+ , K^+ в воде, соках, напитках, молоке и др. продуктах проводится непосредственно в этих продуктах. Если содержание определяемых ионов очень велико, готовят разбавленные растворы жидких продуктов, используя мерную посуду.

При определении ионов Na^+ , K^+ методом ионометрии в спиртосодержащих продуктах необходимо удалить спирт путем кипячения.

2. Определение и расчет содержания ионов Na^+ и K^+ в пищевом сырье и пищевых продуктах методом ионометрии. Подготовленные пробы в количестве 50 см^3 помещают в стаканчик для проведения определений. В стаканчик с помощью пипетки вводят $0,5 \text{ см}^3$ 2 М раствора сульфата аммония и тщательно перемешивают содержимое стеклянной палочкой. Затем в стаканчик с анализируемой пробой опускают электроды и проводят измерения потенциала индикаторного электрода E_x . Определения повторяют трижды, помещая каждый раз в стаканчик свежие порции вытяжки анализируемой пробы. Вычисляют средние значения $E_{\text{ср}}^x$.

По градуировочному графику находят значение $(-\lg C_x)$, затем вычисляют C_x (моль/дм³) (см. п. 4.1.2, с. 114).

Содержание определяемого иона в плодоовощной продукции находят по формуле:

$$q_x = C_x \cdot M(\mathcal{E}_x) \cdot W,$$

где q_x — содержание определяемого иона в образце, мг/100 г; $M(\mathcal{E}_x)$ — молярная масса эквивалента определяемого иона; W — влажность анализируемого продукта; C_x — концентрация определяемого иона, моль/дм³.

Для хлебобулочных изделий и сухих полуфабрикатов процентное содержание (% масс.) определяемых ионов рассчитывают по формуле:

$$q_x = \frac{C_x \cdot V_k M(\mathcal{E}_x) \cdot 100}{100 \cdot m_x},$$

где C_x — концентрация определяемых ионов, моль/дм³; V_k — объем колбы, взятой для приготовления водной вытяжки, см³; $M(\mathcal{E}_x)$ — молярная масса эквивалента определяемого иона; m_x — навеска образца, взятая для приготовления водной вытяжки, г.

Для напитков расчет (в мг/дм³) проводят по формуле:

$$q_x = C_x \cdot M(\mathcal{E}_x).$$

3. Определение ионов Na^+ и K^+ в анализируемых образцах методом пламенной фотометрии. Подготовленные пробы пищевых продуктов (их водные вытяжки) наливают в кюветы и проводят измерения интенсивности спектральных линий, соответствующих Na^+ и K^+ (см. п. 4.1.3).

Измерения проводят трижды.

По градуировочному графику находят значение концентрации по соответствующему значению интенсивности.

При больших концентрациях анализируемых ионов (в случае зашкаливания прибора) водные вытяжки необходимо разбавить в несколько раз, используя мерную посуду.

4. **Определение содержания железа в вине методом фотометрии.** Вино фильтруют через складчатый фильтр. В 3 мерные колбы вместимостью 100 см^3 отбирают пипеткой по 5 см^3 вина. В каждую колбу добавляют по 5 см^3 раствора HCl , одну каплю раствора H_2O_2 , 4 см^3 раствора $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор сравнения готовят так же, но без добавления раствора $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Через 30 мин измеряют оптическую плотность полученных растворов на фотоэлектроколориметре при длине волны 600 нм (красный светофильтр). Оптическую плотность каждого раствора измеряют 3 раза и находят $A_{\text{ср}}$.

По градуировочному графику определяют концентрацию железа (мг/дм^3) в исследуемых растворах (см. п. 4.1.4).

Расчет результатов анализа. Концентрацию железа в образце вина (мг/л) рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{Fe.х}} = C_{\text{Fe}} \cdot \frac{V_{\text{к}}}{V_{\text{в}}},$$

где C_{Fe} — концентрация железа, найденная по градуировочному графику, мг/дм^3 ; $V_{\text{к}}$ — вместимость мерной колбы, см^3 ; $V_{\text{в}}$ — объем исследуемого образца вина, взятый на определение, см^3 .

Лабораторная работа 4.2.2

Определение содержания ионов кальция в соках, виноматериалах и винах

Контроль за содержанием ионов кальция имеет большое значение в производстве ряда пищевых напитков, вырабатываемых на виноградной основе: соков, вин. С увеличением содержания кальция увеличивается вероятность образования и выпадения в осадок виннокислых соединений в виде винного камня. Это требует постановки специальных тестов на склонность к помутнениям и анализа количественного содержания кальция в соках, напитках, винах.

Цель работы: изучение метода определения ионов кальция, который основан на осаждении этих ионов из пробы действием насыщен-

ного раствора щавелевокислого аммония. Образующийся осадок растворяют в серной кислоте и титруют перманганатом калия.

Реактивы и материалы:

- ♦ Щавелевокислый аммоний (насыщенный раствор: 5,8 г щавелево-кислого аммония растворяют в 100 см³ дистиллированной воды).
- ♦ Серная кислота (1 часть концентрированной серной кислоты + 4 части воды).
- ♦ Перманганат калия — 0,1 н. (готовится из фиксаля).

Методика проведения анализа. 25 см³ пробы исследуемого напитка помещают в выпарительную чашку или стеклянный стакан и нагревают на водяной бане до температуры 60...70 °С, к пробе добавляют 5 см³ насыщенного раствора щавелевокислого аммония (небольшими порциями при перемешивании) и продолжают нагрев еще 30 минут. Охлаждают.

Осадок отфильтровывают на стеклянном фильтре № 3 под вакуумом и промывают его 40...30 см³ горячей воды (воду приливают порциями по 10 см³).

Промытый осадок растворяют на фильтре в 20 см³ горячего раствора серной кислоты. Горячий фильтрат титруют раствором перманганата калия.

Обработка результатов. Расчет ведут по формуле:

$$X = \frac{a \cdot \text{КП} \cdot 2,005 \cdot 1000}{b},$$

где X — концентрация кальция, мг/дм³; a — количество 0,1 н. раствора перманганата калия, см³; 2,005 — количество кальция, соответствующее 1 см³ 0,1 н. раствора перманганата калия, мг; 1000 — пересчет на 1 дм³; b — количество пробы, взятой для анализа, см³.

Лабораторная работа 4.2.3

Применение ионометрии для анализа неорганических катионов и анионов в пищевом сырье и пищевых продуктах

Метод ионометрии основан на измерении потенциала индикаторного электрода, погруженного в исследуемый раствор, и расчете концентрации определяемого иона, согласно уравнению Нернста.

Для измерения потенциала используют два электрода: электрод сравнения и индикаторный электрод.

Электрод сравнения (стандартный электрод) — это электрод, потенциал которого известен, имеет постоянное значение и по отношению к которому измеряют потенциал индикаторного электрода. В качестве электрода сравнения, потенциал которого принимают за условный нуль шкалы потенциалов, берут стандартный водородный или хлорсеребряный электрод.

В качестве индикаторных электродов в ионометрии широко используются мембранные ионоселективные электроды, функционирующие по механизму переноса ионов, т. е. обладающие ионной проводимостью. Поскольку мембрана электрода проницаема для одного или ограниченного числа ионов, то это свойство обеспечивает достаточно высокую селективность (избирательность) электрода. Таким образом, ионоселективный электрод — это индикаторный электрод с относительно высокой специфичностью к отдельному иону или типу ионов. К ионоселективным относятся: стеклянные электроды, электроды на основе жидких ионитовых мембран, электроды с твердыми ионитовыми мембранами (гомогенными и гетерогенными), газовые электроды.

Уравнение Нернста для ионоселективных электродов имеет вид (уравнение Никольского):

$$E_B = \text{const} \pm \left(\frac{0,059}{n} \cdot \lg \left(a_i + k_{ij} a_j^{\frac{n}{Z_j}} \right) \right),$$

где a_i , a_j — активность определяемого и мешающего ионов; k_{ij} — коэффициент селективности электрода по отношению к определяемому иону i на фоне мешающего иона j ; Z_j — заряд мешающего иона; n — заряд определяемого иона.

Коэффициент селективности K_{ij} позволяет оценить возможность использования данного ионоселективного электрода в присутствии других ионов. Коэффициенты селективности приведены в инструкциях, прилагаемых к электродам. Селективность является важной характеристикой ионоселективного электрода.

Другой важной характеристикой является крутизна. Под крутизной электродной характеристики понимают тангенс угла наклона кривой $E = f(-\lg C)$. По значению крутизны судят об эффективности электрода.

Обычно для установления зависимости между потенциалом электрода и активностью или концентрацией определяемых ионов строят градуировочный график зависимости $E = f(-\lg C)$. Для построения его используют стандартные растворы с различной концентрацией опре-

деляемого иона при допущении, что зависимость между E и логарифмом активности иона имеет линейный характер.

Для проведения прямых потенциометрических определений с помощью ионоселективного электрода можно использовать метод добавок стандартного раствора определяемого иона.

Цель работы: изучение метода ионометрии для определения некоторых ионов в сырье и пищевых продуктах.

Реактивы и материалы:

- ♦ Нитрат натрия 0,1 М раствор.
- ♦ Сульфат калия 0,1 М раствор; хлорид кальция 0,1 М раствор.
- ♦ Сульфат аммония 0,1 М раствор.
- ♦ Хлорид натрия 0,1 М раствор; сульфат аммония 2 М раствор.
- ♦ Хлорид калия 0,1 М раствор; иодид калия 0,1 М раствор.
- ♦ рН — метр милливольтметр.
- ♦ Ионоселективные электроды: с нитратной функцией, стеклянный электрод ЭСЛ-51-11, с кальциевой функцией, с иодидной функцией и др.).
- ♦ Электрод сравнения — хлорсеребряный электрод ЭВЛ-1МЗ.

Подготовка проб пищевых продуктов для анализа

А. Хлебобулочные изделия и другие сухие пищевые продукты и полуфабрикаты. На технических весах берут навеску продукта (см. табл. 4.5, с. 119) переносят ее в мерную колбу. Объем колбы доводят дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы тщательно перемешивают в течение 1...3 минут. Затем колбу оставляют для осаждения нерастворимой части, после чего надосадочную жидкость (водную вытяжку) аккуратно сливают в коническую колбу и в дальнейшем используют для анализа.

Б. Плодоовощная продукция. Образец анализируемого продукта (картофель, морковь, свекла и др.) тщательно моют, нарезают на куски и с помощью соковыжималки получают клеточный сок продукта, который затем используют для анализа.

В. Напитки, соки, вино. Анализ содержания катионов и анионов в напитках, соках, винах и других пищевых продуктах проводится непосредственно в этих продуктах. Если содержание определяемых ионов велико, готовят разбавленные растворы этих продуктов, используя мерную посуду.

При определении катионов и анионов в спиртосодержащих продуктах необходимо удалить спирт путем кипячения.

Изучение некоторых электродных характеристик

Построение градуировочного графика. Для построения градуировочного графика необходимо приготовить серию стандартных растворов (см. табл. 4.1, с. 114).

2 М раствор сульфата аммония используют в качестве постороннего индифферентного электролита.

В зависимости от применяемого для анализа электрода, используют в качестве исходных растворы солей, содержащих определяемый ион, с концентрацией 0,1 М.

Наименования солей и типы ионоселективных электродов указаны в табл. 4.6.

Таблица 4.6

Выбор соли в зависимости от типа ионоселективного электрода

Определяемый ион	Ионоселективный электрод	Исходный раствор соли, 1 М
NO_3^-	С нитратной функцией	Нитрат натрия
Ca^{2+}	С кальциевой функцией	Хлорид кальция
Na^+	Стекланный	Хлорид натрия
I^-	С иодидной функцией	Иодид калия
Cl^-	С хлоридной функцией	Хлорид натрия или калия

В стаканчик для определения последовательно наливают, переходя от меньших концентраций к большим, по 30...50 см³ приготовленного стандартного раствора. В каждом из этих растворов проводят измерение потенциала индикаторного электрода (не менее трех раз).

Результаты измерений. Результаты измерений потенциала индикаторного электрода E вносят в таблицу (см. табл. 4.2, с. 115).

По полученным данным строят градуировочный график $E = f(-\lg C)$, используя средние значения потенциала индикаторного электрода $E_{\text{ср}}$.

Типичные формы градуировочного графика для нитратного, натриевого ионоселективных электродов представлены на рис. 4.4.

Методом построения градуировочного графика определяют следующие основные параметры электрода:

- ♦ область прямолинейной концентрационной зависимости потенциала;
- ♦ реальную крутизну электродной функции;
- ♦ коэффициент селективности относительно различных ионов.

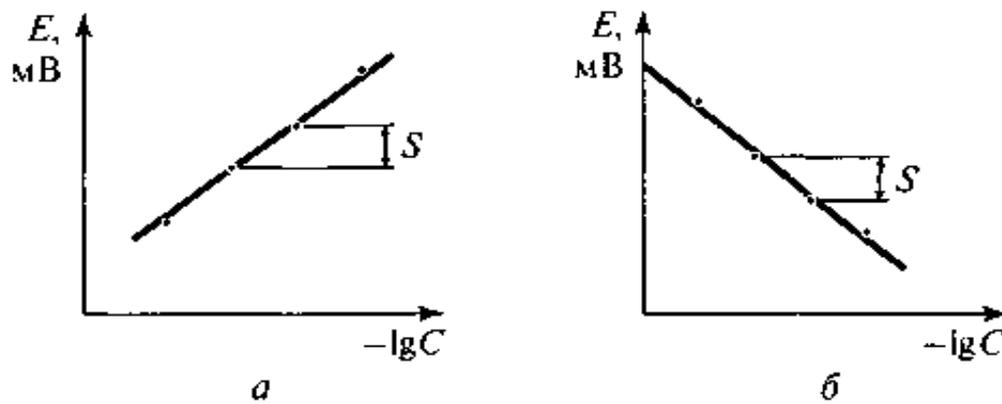


Рис. 4.4. Градуировочный график для электрода:
a — нитратного; *б* — натриевого

Определение коэффициента селективности K_c ионоселективного электрода

Для определения K_c того или иного электрода из исходных растворов солей готовят серию стандартных растворов (аналогично приготовлению растворов для построения градуировочного графика), но в данном случае разбавление растворов проводят не дистиллированной водой, а раствором мешающего иона с концентрацией 0,1 М. Исходные растворы солей для приготовления серии стандартных растворов и растворы, содержащие мешающий ион, для каждого типа электродов представлены в табл. 4.7.

Таблица 4.7

Исходные растворы солей и растворы, содержащие мешающий ион

Ионоселективный электрод	Исходный раствор соли для приготовления стандартных растворов, 0,1 М	Раствор мешающего иона, 0,1 М
С калиевой функцией	KNO_3	NaCl
С натриевой функцией (стеклянный)	NaCl	KNO_3
С нитратной функцией	KNO_3	KCl или NaCl
С кальциевой функцией	$CaCl_2$	$MgSO_4$
С хлоридной функцией	KCl или NaCl	KNO_3
С йодидной функцией	KI	KCl

Приготовленные растворы поочередно помещают в стаканчик для проведения измерений и определяют значение потенциала индикатора.

торного электрода, начиная с раствора с минимальной концентрацией. Определение E проводят в трех повторностях. Полученные данные вносят в таблицу (табл. 4.2, с. 115).

Построение графика. По этим данным строят график зависимости $E = f(\lg C)$. В данном случае по мере уменьшения активности (концентрации) основного иона C_0 нарастает влияние мешающего иона C_M . В предельном случае кривая $E = f(-\lg C)$ становится независимой от C_0 . Это означает, что электрод взамен основной функции приобрел функцию мешающего иона. Точка пересечения Нернстовского (прямолинейного) участка кривой с горизонтальной прямой (см. рис. 4.4) отвечает условию $E_0 = E_M$, тогда коэффициент селективности K_c может быть рассчитан как отношение минимальной концентрации основного иона, при которой потенциал индикаторного электрода не зависит от концентрации мешающего иона, к концентрации мешающего иона:

$$K_c = \frac{C_0^{\min}}{C_M}$$

Пример расчета коэффициента селективности K_c нитратного ионо-селективного электрода в присутствии мешающего сульфат-иона. По данным, полученным при измерении потенциала ионоселективного электрода в каждом из стандартных растворов KNO_3 на фоне $0,1 M$ раствора сульфата натрия, построен график зависимости $E = f(-\lg C_{NO_3^-})$ (рис. 4.5).

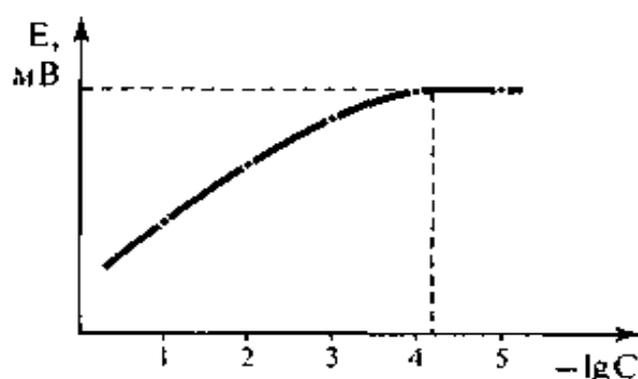


Рис. 4.5. График зависимости $E = f(-\lg C_{NO_3^-})$ на фоне $0,1 M$ раствора сульфата натрия

По графику определена $C_{NO_3^-}^{\min}$ как точка пересечения прямолинейного участка кривой с горизонтальной прямой.

Коэффициент селективности рассчитывается по формуле:

$$K_c = \frac{C_{NO_3^-}^{\min}}{C_{SO_4}^2}$$

Для приведенного примера:

$$K_c = \frac{5 \cdot 10^{-5}}{10^{-1}} = 5 \cdot 10^{-4}$$

Определение и расчет содержания неорганических катионов и анионов в пищевом сырье и пищевых продуктах

Флодоовощная продукция. Полученный с помощью соковыжималки клеточный сок исследуемого продукта в количестве 50 мл помещают в стаканчик для проведения определений. В стаканчик с помощью пипетки вводят 0,5 мл 2 М раствора сульфата аммония (в качестве индифферентного электролита) и тщательно перемешивают содержимое стеклянной палочкой. Затем в стаканчик с анализируемой пробой опускают электроды и проводят измерение потенциала индикаторного электрода E_x^0 . Определение повторяют трижды, помещая каждый раз в стаканчик свежие порции клеточного сока. Вычисляют средние значения $E_{x\text{cp}}^0$.

По ранее полученному для данного электрода градуировочному графику находят значение $-\lg C_x$ и затем по таблице антилогарифмов или с помощью калькулятора определяют величину C_x (моль/л).

Содержание определяемого иона в мг/100 г продукта в анализируемом образце находят по формуле:

$$q_x = C_x \cdot M(\mathcal{E}_x) \cdot W,$$

где q_x — содержание определяемого иона в образце, мг/100 г; $M(\mathcal{E}_x)$ — молярная масса эквивалента определяемого иона; W — влажность анализируемого продукта, %.

Хлебобулочные изделия и другие сухие полуфабрикаты

С помощью градуировочного графика. Водную вытяжку образца в количестве 50 см³ помещают в стаканчик для проведения определения и туда же вводят 0,5 см³ 2 М раствора сульфата аммония, тщательно перемешивают содержимое. Затем в стаканчик опускают электроды и измеряют потенциал индикаторного электрода E_x . Измерение проводят в трех повторностях и затем находят среднее значение $E_{x\text{cp}}$ (табл. 4.2, с. 115). По градуировочному графику для данного электрода определяют концентрацию C_x . По таблице антилогарифмов или с помощью калькулятора находят C_x .

Процентное содержание в % масс определяемых ионов в образце рассчитывают по формуле:

$$q_x = \frac{C_x \cdot V_k \cdot M(\mathcal{E}_x) \cdot 100}{100 \cdot m_x},$$

где C_x — концентрация определяемых ионов, моль/дм³; V_k — объем колбы, взятой для приготовления водной вытяжки, см³; $M(\mathcal{E}_x)$ — молярная масса эквивалента определяемого иона; m_x — навеска образца, взятая для приготовления водной вытяжки, г.

По методу добавок. После определения значения E_x индикаторного электрода в 50 см^3 водной вытяжки из анализируемого образца к ней с помощью пипетки добавляют 10 мл стандартного раствора определяемого иона с концентрацией 10^{-2} М . Регистрируют значение потенциала индикаторного электрода после введения добавки E_d .

Рассчитывают значение неизвестной концентрации ионов C_x (в моль/л) с помощью формулы:

$$C_x = \frac{C_q V_q}{V_0 V_q} \cdot \frac{1}{10^{\frac{\Delta E}{S}} - V_0},$$

где V_0 — объем анализируемой пробы до введения добавки (50 мл); V_q — объем внесенной добавки (10 мл); C_q — концентрация добавки (10^{-2} М); $\Delta E = (E_x - E_d)$ — наблюдаемое изменение потенциала после введения добавки, мВ; S — крутизна электродной характеристики в мВ, установленная по градуировочному графику.

Лабораторная работа 4.2.4

Определение некоторых ионов (Fe, Cu, Ni и Mn) в пищевых продуктах методом атомно-абсорбционной спектроскопии

Атомная абсорбция — аналитический метод, основанный на поглощении газообразными атомами ультрафиолетового или видимого излучения.

Цель работы: ознакомление с методом атомно-абсорбционной спектроскопии и определение некоторых ионов металлов в пищевом продукте этим методом.

Аппараты, реактивы и материалы:

- ♦ Атомно-абсорбционный спектрофотометр.
- ♦ Кислота азотная, раствор 1 : 1.
- ♦ Кислота азотная, раствор 2 моль/дм³.
- ♦ Основной стандартный раствор меди, $c [\text{Cu}] = 1 \text{ мг/см}^3$.
- ♦ Основной стандартный раствор никеля, $c [\text{Ni}] = 1 \text{ мг/см}^3$.
- ♦ Основной стандартный раствор марганца, $c [\text{Mn}] = 1 \text{ мг/см}^3$.
- ♦ Основной стандартный раствор железа, $c [\text{Fe}] = 1 \text{ мг/см}^3$.

Подготовка проб к проведению анализа

Ассортимент пищевых продуктов очень широкий, и содержание в них ионов металлов разное, поэтому и величины навесок образцов для анализа различны. Примерные величины навесок пищевых продуктов:

Наименование сырья, пищевых продуктов	Навеска
Фрукты, овощи, продукты переработки фруктов и овощей, г	5...10
Зерно и продукты его переработки, г	5...10
Хлеб и хлебобулочные изделия, г	5...10
Кондитерские изделия, г	5...10
Напитки, вино, пиво, см ³	25...50

А. Зерно, мука, крупа, хлеб, хлебобулочные и кондитерские изделия. Пробы продуктов берут в трех параллельных повторностях. Навески помещают в тигли, ставят на электрическую плитку и при слабом нагреве обугливают пробы до исчезновения дыма. Затем тигли помещают в муфельную печь, температуру в которой постепенно увеличивают до 450 °С. Для того чтобы ускорить процесс минерализации, поступают следующим образом: после получения бурой золы ее смачивают разбавленной азотной кислотой (1:1), упаривают на электроплитке при слабом нагреве и далее снова озоляют в муфельной печи до получения белой (или слегка окрашенной) золы. При необходимости обработку азотной кислотой повторяют. К полученной белой золе добавляют 2 см³ концентрированной азотной кислоты и осторожно упаривают на электроплитке до влажных солей.

Б. Фрукты, овощи, продукты переработки фруктов и овощей. Пробы высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С. Затем содержимое тиглей смачивают азотной кислотой так, чтобы вся поверхность проб была покрыта кислотой, и нагревают на водяной бане до прекращения выделения окислов азота (данную операцию проводят обязательно в вытяжном шкафу). Обработку проб азотной кислотой повторяют еще два раза. Обработанные пробы обугливают на электроплитке до исчезновения дыма, затем помещают в муфельную печь и далее продолжают минерализацию, как описано в пункте (А).

В. Напитки, вино, пиво. Газированные напитки, шипучие вина, пиво перед минерализацией освобождают от углекислого газа. Для этого их достаточно нагреть до температуры 50...60 °С. Затем пипеткой отмеривают пробы, помещают их в тигли. Пробы ставят на электроплитку со слабым нагревом и упаривают досуха (не допуская разбрызгивания). Затем пробы обугливают на электроплитке до исчезновения дыма и ставят в муфельную печь. Далее продолжают минерализацию, как описано в пункте (А).

Минеральный остаток растворяют в мерной колбе вместимостью 25 см³ (или 50 см³ в зависимости от ожидаемого содержания определяемого элемента в пробе). Тигель несколько раз смывают небольшими

порциями (2...3 см³) 2 М раствора HNO₃ и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ через обеззоленный фильтр (синяя лента). Затем раствор доводят до метки 2 М раствором HNO₃.

**Измерение абсорбции стандартных растворов
и построение градуировочного графика**

Готовят стандартный раствор анализируемого элемента с концентрацией 100 мкг/см³. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят пипеткой 10 см³ основного стандартного раствора этого элемента и раствор в колбе доводят до метки 2 М раствором азотной кислоты.

Затем готовят серию стандартных растворов. Для этого в 7 мерных колб вместимостью 100 см³ вносят последовательно 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 см³ приготовленного стандартного раствора и доводят до метки 2 М раствором азотной кислоты.

В качестве нулевого стандарта используют 2 М раствор азотной кислоты.

После подготовки к работе атомно-абсорбционного спектрофотометра приступают к фотометрированию растворов.

Методика проведения анализа. Распыляя в пламя горелки нулевой стандарт, устанавливают показания прибора на нуль. Затем в порядке возрастания концентрации измеряют абсорбцию приготовленных стандартных растворов. При переходе на измерение абсорбции растворов следующего элемента производят замену лампы с полым катодом. Измерение абсорбции каждого раствора проводят не менее трех раз и рассчитывают среднее значение I . Результаты измерения вносят в табл. 4.8.

Таблица 4.8

Результаты измерения абсорбции стандартных растворов _____
(элемент)

C , мкг/мл	I_1	I_2	I_3	$I_{\text{ср}}$
0,5				
1,0				
1,5				
2,0				
2,5				
3,0				
4,0				

По полученным данным строят градуировочные графики зависимости $I=f(c)$ для каждого определяемого элемента (Cu, Ni, Mn, Fe).

Измерение абсорбции исследуемых растворов и расчет результатов анализа

Таким же образом измеряют абсорбцию в исследуемых растворах минерализата пищевого продукта (не менее трех раз). Рассчитывают $I_{\text{ср}}$ и по градуировочным графикам находят концентрацию каждого анализируемого элемента (C , мкг/см³).

Расчет содержания определяемого элемента в образце проводят по формуле:

$$Q_x = \frac{CV_k}{m}, \text{ мг/кг; или } Q_x = \frac{CV_k}{V}, \text{ мг/дм}^3,$$

где Q_x — концентрация определяемого элемента, найденная по градуировочному графику; V_k — вместимость мерной колбы, в которой приготовлен раствор минерализата, см³; m — масса навески образца, взятая на анализ, г; V — объем образца, взятый на анализ (в случае анализов напитков, вин, пива и т.п.), см³.

Контрольные вопросы

1. Как классифицируются минеральные вещества?
2. Какие физико-химические методы анализа используются для анализа минеральных веществ?
3. На чем основан метод ионометрии? Какие индикаторные электроды используют в этом методе?
4. В чем сущность метода пламенной фотометрии? Какие ионы можно определять этим методом?
5. Метод градуировочного графика. В каких координатах он строится в методе пламенной фотометрии?
6. На чем основан метод атомно-абсорбционной спектроскопии? В чем его преимущества по сравнению с методом пламенной фотометрии?
7. Как проводится подготовка проб пищевых продуктов для анализа методом атомно-абсорбционной спектроскопии?
8. Что служит источником излучения в атомно-абсорбционном спектрофотометре?

Т Е М А 5

ВИТАМИНЫ

5.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Витамины — важнейшие незаменимые пищевые вещества (нутрицевтики) — низкомолекулярные органические соединения, необходимые для осуществления механизмов ферментативного катализа, нормального течения обмена веществ, поддержания гомеостаза, биохимического обеспечения всех жизненных функций организма.

Существование витаминов и их необходимость для жизни человека и животных впервые были доказаны в 1870 г. русским ученым В. И. Луниным, работавшим в Тартуском университете. В начале XX в. польский ученый Казимир Функ назвал эти вещества витаминами. Все известные в настоящее время витамины были открыты в первой половине XX века. Сегодня их получают синтетическим путем в виде чистых веществ и выпускают в виде таблеток, драже и т. п.

Организм человека не синтезирует витамины или синтезирует в недостаточном количестве (например, никотиновую кислоту) и должен обязательно получать их с пищей. Витамины обладают высокой биологической активностью. В отличие от других незаменимых пищевых веществ (незаменимые аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, некоторые минеральные вещества), витамины не являются пластическим материалом или источником энергии, а участвуют в обмене веществ как катализаторы и регуляторы отдельных биохимических и физиологических процессов.

В настоящее время известно 13 витаминов, жизненно необходимых человеку. Организм испытывает потребность лишь в очень небольшом их количестве — от нескольких микрограммов (витамин B_{12}) до нескольких десятков миллиграммов (витамин С).

Принято различать водорастворимые и жирорастворимые витамины. К водорастворимым относятся аскорбиновая кислота (витамин С) и витамины группы В — тиамин (витамин B_1), рибофлавин (витамин B_2),

пиридоксин (витамин В₆), витамин В₁₂ (кобаламин), ниацин (витамин РР), фолацин (фолиевая кислота), пантотеновая кислота и биотин. К группе жирорастворимых витаминов относятся витамины А, D, Е и К. Они поступают в организм в составе жиросодержащих продуктов, для их всасывания также необходимо присутствие жира.

Для количественного определения витаминов в пищевых продуктах используются химические, физико-химические, биохимические и микробиологические методы.

Современная аналитическая техника (газовая капиллярная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография и др.) позволяет определять содержание витаминов в пищевых продуктах с высокой степенью надежности (точности).

Лабораторная работа 5.1.1

Одновременное определение витаминов А, Е и каротиноидов в БАД методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Метод определения витаминов А, Е и каротиноидов, включая β-каротин, α-каротин, ликопин, криптоксантин, лютеин, зеаксантин, при совместном присутствии в биологически активных добавках (витаминное драже, таблетки, порошки и кристаллические витаминные препараты, их растворы или суспензии в жирах) основан на экстракции этих микронутриентов органическим растворителем после щелочного омыления субстрата (1) или непосредственного растворения, упаривании полученного экстракта и переводе сухого остатка в другой растворитель, введении экстракта на ВЭЖХ колонку для хроматографического разделения и последующего определения с помощью флуоресцентного и спектрофотометрического детекторов (2). Определение массовой концентрации витаминов и каротиноидов основано на измерении площади (или высоты) пика при соответствующей каждому соединению длине волны детектирования после введения в хроматографическую систему анализируемых проб и градуировочных растворов.

Для предотвращения разрушения витаминов и каротиноидов анализ БАД и стандартов проводят в присутствии антиоксиданта — аскорбиновой кислоты, предохраняя пробы от попадания на них прямого солнечного света.

5.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ, ВИТАМИНОВ А, Е И β-КАРОТИНА

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки, после определения градуировочного коэффициента.

Для определения градуировочного коэффициента готовят несколько (не менее 4) калибровочных растворов витамина А (полностью транс-ретинол кристаллический; ретинола ацетат по Госфармакопея (X изд., ст. 578); ретинола пальмитат по ФС 42-2229-84) с концентрацией от 0,3 до 3 мкг/см³, витамина Е с концентрацией от 2 до 20 мкг/см³ (D,L-α-токоферол; α-токоферола ацетат по ФС 42-2495-87), β-каротина с концентрацией от 0,2 до 1,5 мкг/см³.

Приготовление градуировочных растворов витамина А

Реактивы и материалы:

- ♦ Витамин А — транс-ретинол кристаллический.
- ♦ Ретинолацетат (Госфармакопея, X изд., стр. 578).
- ♦ Ретинолпальмитат (ФС 42-2229-84), концентрация 0,3...3 мкг/см³.
- ♦ Этанол.
- ♦ КОН, 50 %-ный раствор.
- ♦ Гексан.

Для приготовления градуировочных растворов ретинола 0,01 г витамина А количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 50 см³ этанола. Содержимое колбы тщательно перемешивают до полного растворения кристаллов ретинола, после чего объем в колбе доводят до метки этанолом и содержимое колбы вновь тщательно перемешивают. После введения в колбу на 100 см³ аликвоты раствора витамина А в этаноле (0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 см³) добавляют растворитель до метки.

Для приготовления калибровочных растворов из ацетата ретинола (пальмитата ретинола) 0,01 г витамина А помещают в коническую колбу вместимостью 100 см³, прибавляют 30 см³ этанола, 3 см³ 50 %-ного раствора гидроокиси калия и нагревают в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре 63...68 °С. Содержимое колбы быстро охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят 50 см³ воды в делительную воронку и извлекают 150 см³ гексана (3 раза по 50 см³) в течение двух минут. Объединенные гексановые экстракты промывают водой по 50 см³ до исчезновения щелочной реакции в промывных водах (по индикаторной бумаге). Промытые гек-

сановые экстракты количественно переносят в колбу вместимостью 200 см³ и доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Из полученного раствора отбирают 1, 2, 3, 4, 5 см³ раствора в мерные колбы вместимостью 100 см³, упаривают в токе азота, сухой остаток растворяют в этаноле и доводят объемы до метки тем же растворителем.

Приготовление градуировочных растворов витамина E

Реактивы и материалы:

- ♦ D,L- α -токоферол (по ФС 42-2495-87).
- ♦ α -Токоферол ацетат (по ФС 42-2495-87).
- ♦ Дихлорэтан.
- ♦ Аскорбиновая кислота.
- ♦ Этанол.
- ♦ Гексан.
- ♦ КОН, 50 %-ный раствор.

Для приготовления градуировочных растворов из α -токоферола 0,02 г витамина E количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 2 см³ дихлорметана. Содержимое колбы тщательно перемешивают до полного растворения токоферола, после чего объем в колбе доводят до метки этанолом и содержимое колбы вновь тщательно перемешивают. После введения в колбу на 100 см³ аликвоты раствора витамина E в этаноле (1, 3, 5, 7, 10 см³) добавляют растворитель до метки.

Для приготовления градуировочных растворов из ацетата α -токоферола 0,02 г витамина E количественно переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³, добавляют 0,2 г аскорбиновой кислоты, 30 см³ этанола, 3 см³ 50 %-ного раствора гидроксида калия и нагревают в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре 63...68 °С. Содержимое колбы быстро охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят 50 см³ воды в делительную воронку и извлекают 150 см³ гексана (3 раза по 50 см³) в течение двух минут. Объединенные гексановые экстракты промывают водой по 50 см³ до исчезновения щелочной реакции промывных вод (по индикаторной бумаге). Промытые гексановые экстракты количественно переносят в колбу вместимостью 200 см³ и доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Из полученного раствора отбирают 2, 4, 6, 8, 10 см³ раствора в мерные колбы вместимостью 100 см³, упаривают в токе азота, сухой остаток растворяют в 1 см³ дихлорметана и доводят объемы до метки этанолом.

Приготовление градуировочных растворов каротиноидов

Реактивы и материалы:

- ♦ β-Каротин кристаллический.
- ♦ Дихлорэтан.
- ♦ Этанол.

Для приготовления градуировочных растворов β-каротина 5 мг кристаллического β-каротина количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³, добавляют 1 см³ дихлорметана. Содержимое колбы тщательно перемешивают до полного растворения кристаллов, после чего объем в колбе доводят до метки этанолом и содержимое колбы вновь тщательно перемешивают. После перенесения в колбу на 100 см³ аликвоты раствора β-каротина в этаноле (0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 см³) добавляют растворитель до метки. Градуировочные растворы других каротиноидов (α-каротина, ликопина, β-криптоксантина, лютеина, зеаксантина) готовят аналогично раствору β-каротина.

Полученные растворы хранят в холодильнике при 2...8 °С не более 6 месяцев.

Массовую концентрацию витаминов и каротиноидов в градуировочных растворах (С, мкг/см³) уточняют спектрофотометрическим методом. Для этого определяют оптическую плотность (D) слоя градуировочного раствора толщиной 1 см по отношению к растворителю при длине волны, указанной в табл. 5.1, и рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{D \cdot 10^4}{E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot l},$$

где $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ — коэффициент светопоглощения, см³ · мкг⁻¹ · см⁻¹; l — толщина слоя раствора, см; 10⁴ — коэффициент пересчета.

Таблица 5.1

Условия проведения спектрофотометрических измерений

Витамин (каротиноид)	Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$E_{1\text{ см}}^{1\%}$
Ретинол	Этанол	325	1832
α-Токоферол	Этанол	292	75,8
β-Каротин	Этанол	453	2620
α-Каротин	Гексан	445	2710
Ликопин	Гексан	474	3470
β-Криптоксантин	Гексан	451	2460
Зеаксантин	Этанол	452	2480
Лютеин	Этанол	447	2560

Градуировка прибора

Градуировка хроматографической системы проводится для проверки и установления того, что область определяемых концентраций лежит в пределах линейного участка градуировочного графика, построенного по площадям (высотам) пиков. Она проводится в следующих случаях:

- ♦ на этапе освоения методики;
- ♦ при смене колонки и/или предколонки;
- ♦ при замене стандартного образца;
- ♦ в случаях, когда есть основания полагать, что изменилась эффективность хроматографической системы или чувствительность детектора.

Градуировку хроматографа проводят, строя градуировочный график по серии градуировочных растворов. Аналитический сигнал (площадь, мм² или высота пика, мм) фиксируют на интеграторе или самописце, соблюдая условия и продолжительность хроматографического разделения и детектирования (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Условия детектирования витаминов А, Е и каротиноидов

Детектор	Условия детектирования		
	Витамины (каротиноиды)	Длина волны детектирования	Продолжительность, мин
Флуориметрический	Витамин А	$\lambda_{\text{возб}} = 325 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эмисс.}} = 480 \text{ нм}$	0...6
	Витамин Е	$\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эмисс.}} = 30 \text{ нм}$	6,1...16
Спектрофотометрический	Каротиноиды	$\lambda = 450 \text{ нм}$	0...30

Ориентировочные времена удерживания и последовательность выхода витаминов из хроматографической колонки: ретинол — 4,0...4,5 мин, α -токоферол — 10,5...11,0 мин (флуориметрическое детектирование), β -каротин > α -каротин > ликопин > β -криптоксантин > лютеин > зеаксантин (спектрофотометрическое детектирование).

Градуировочный график строят в координатах «аналитический сигнал» — «концентрация витамина в градуировочном растворе, мкг/см³». Для каждого анализируемого раствора проводят два параллельных измерения и находят среднее арифметическое. Различие между измеренными значениями аналитических сигналов и времен

удерживания не должно превышать 5 % от средних значений. Линейные участки градуировочного графика должны соответствовать всему диапазону определяемых концентраций микронутриентов. Коэффициент градуировочного графика ($k_{гр}$) определяют как среднее арифметическое значение коэффициентов k_i , вычисляемых по формуле:

$$K_i = \frac{C_i}{S_i},$$

где C_i — массовая концентрация микронутриентов в градуировочном растворе, мкг/см³; S_i — площадь (высота) аналитического сигнала.

Описание хроматографической системы

Подготовку к работе хроматографической системы, состоящей из последовательно соединенных насоса высокого давления, спектрофотометрического и флуориметрического детекторов и интеграторов проводят в соответствии с руководством по эксплуатации.

Используется система для ВЭЖХ следующей конфигурации:

- ♦ аналитическая хроматографическая колонка (типа картридж «Элсикарт» фирмы «Элсико», Россия) из нержавеющей стали, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4 мм, с обращеннофазным сорбентом, например Нуклеосил 100 С18, зернением 5 мкм или другим, аналогичным по свойствам, с эффективностью по β-каротину не ниже 5000 теоретических тарелок;
- ♦ предколонка из нержавеющей стали длиной 50 мм, внутренним диаметром 4 мм с сорбентом типа «Нуклеосил» 100 С18, 7 мкм или аналогичным по свойствам;
- ♦ петлевой кран-дозатор (инжектор ввода пробы типа «Реодайн 7125», США) с рабочим объемом петли 50 мм³;
- ♦ объемная скорость подачи подвижной фазы — 0,6 см³/мин.

Подготовка пробы к анализу

Подготовка проб к анализу производится непосредственно перед анализом. Взвешивают не менее 10 таблеток (драже, порошкообразное содержимое капсул) и определяют вес одной штуки, затем материал тщательно растирают и перемешивают в фарфоровой ступке. Точную навеску анализируемого материала m , г (0,05...0,20 г) помещают в плоскодонную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 15 см³ воды и нагревают на водяной бане при температуре от 60 до 70 °С при переме-

шивании в течение 5 мин. Затем прибавляют 30 см³ этанола, 0,1 г аскорбиновой кислоты, 3 см³ 50 %-ного раствора гидроокиси калия и нагревают в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре кипения смеси. Содержимое колбы быстро охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят в делительную воронку и экстрагируют неомыляемые вещества 150 см³ гексана (3 раза по 50 см³) в течение двух минут. Объединенные гексановые экстракты промывают водой по 50 см³ до исчезновения щелочной реакции промывных вод (по универсальной индикаторной бумаге). Промытые гексановые экстракты количественно переносят в колбу объемом V₁ (200 см³) и доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Аликвоту V₂ (2 см³) полученного раствора переносят в мерную пробирку на 10 см³, упаривают в токе азота, сухой остаток растворяют в точно измеренном объеме V₃ (1 см³) подвижной фазы.

Измерение концентрации витаминов и каротиноидов в экстракте пробы

Полученный раствор анализируют дважды с помощью хроматографической системы.

Идентификацию пиков проводят, сопоставляя времена удерживания и спектральные отношения с временами удерживания и спектральными отношениями растворов соответствующих стандартов (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Идентификация пиков витаминов и каротиноидов

Витамин	Время удерживания, мин	Условия детектирования (λ , нм)		Соотношение аналитических сигналов (1:2)
		первого	второго	
Ретинол	4,0...4,5	$\lambda_{\text{возб}} = 325$, $\lambda_{\text{эмисс}} = 480$	$\lambda_{\text{возб}} = 340$, $\lambda_{\text{эмисс}} = 95$	1,2...1,3
α -Токоферол	10,5...11,0	$\lambda_{\text{возб}} = 295$, $\lambda_{\text{эмисс}} = 330$	$\lambda_{\text{возб}} = 305$, $\lambda_{\text{эмисс}} = 340$	1,9...2,0
β -Каротин	28...30	450	470	1,1...1,2
α -Каротин	24...26	450	470	1,2...1,3
Ликопин	17...18	450	470	0,7...0,8
β -Криптоксантин	11...12	450	480	1,0...1,1
Лютеин	5,0...5,5	450	480	1,2...1,3
Зеаксантин	5,6...6,5	450	480	1,2...1,3

Концентрацию витаминов и β-каротина в растворе пробы ($C_{пр}$, мкг/см³) определяют по формуле:

$$C_{пр} = k_{гр} S_{пр},$$

где $S_{пр}$ — площадь (высота) пика витамина или каротиноида в растворе пробы; $k_{гр}$ — коэффициент градуировочного графика.

За окончательный результат определения концентрации микронутриентов в растворе пробы принимают среднее арифметическое результатов параллельных измерений, допускаемое относительное расхождение между которыми не должно превышать 5% от среднего значения.

Представление результатов

Содержание микронутриентов (X), выраженное в мг на 1 г пищевой добавки, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{0,001 \cdot C_{пр} V_1 V_3}{V_1 m},$$

где $C_{пр}$ — концентрация витамина или каротиноида в анализируемом растворе (мкг/см³); коэффициент 0,001 учитывает пересчет содержания витаминов и β-каротина в мг.

Лабораторная работа 5.2.2

Метод определения аскорбиновой кислоты (витамин С)

Определение витамина С в биологически активных добавках к пище основано на определении непосредственно аскорбиновой кислоты (АК) без учета окисленной формы витамина С — дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК).

Для целей рутинного анализа наиболее легко и доступно определение методом визуального титрования с использованием количественного окисления аскорбиновой кислотой раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Однако этот метод применим только для объектов исследования, дающих светлоокрашенные экстракты. В других случаях используют метод потенциометрического титрования, спектрофотометрические и флуориметрические методы анализа, которые применимы для любых объектов исследования.

Реактивы и материалы:

- ♦ 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия (трилон Б).
- ♦ Щавелевая кислота, 2 %-ный раствор.
- ♦ Соляная кислота, 2 %-ный раствор.
- ♦ Трихлоруксусная кислота, 3 %-ный раствор.
- ♦ Метафосфорная кислота, 6 %-ный раствор.

Подготовка средней пробы к анализу. Подготовка проб к анализу производится непосредственно перед анализом. Выделение витамина необходимо осуществлять возможно быстрее, без использования повышенной температуры, не на ярком свете и при минимальном контакте образца с кислородом воздуха.

Подготовка аналитической пробы. Из измельченной и перемешанной пробы берут навеску не менее 0,5...1 г, взвешенную с погрешностью $\pm 0,0001$ г. При расчете массы необходимой навески можно пользоваться следующей формулой:

$$m = \frac{10 \cdot V_{\text{обш}}}{V_{\text{пр}} \cdot B_{\text{заявл}}}$$

m — навеска исследуемого образца, г; $V_{\text{обш}}$ — общий объем экстракта, см^3 ; $V_{\text{пр}}$ — объем экстракта, взятого на титрование, см^3 ; $B_{\text{заявл}}$ — заявленное содержание аскорбиновой кислоты в исследуемом образце, $\text{мг}/100$ г.

Навески жидких проб (витаминизированные соки, напитки и т. п.) отбирают пипеткой. Навески проб густой консистенции (сиропы, концентраты и пр.), плохо стекающие из пипетки, берут весовым путем подобно твердым продуктам. Затем в этих пробах определяют по общим правилам плотность для пересчета содержания витамина на единицу объема.

Определение витамина С в образцах, дающих неокрашенные или слабоокрашенные экстракты

Определение витамина С в образцах, дающих неокрашенные или слабоокрашенные экстракты основано на экстрагировании аскорбиновой кислоты или ее солей раствором кислоты (соляной, щавелевой, трихлоруксусной, метафосфорной или смесью уксусной и метафосфорной) с последующим визуальным титрованием раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до установления светло-розовой окраски.

Выбор экстрагирующего раствора:

Экстрагирующий агент	Область применения
2 % соляная кислота	Дражированные, таблетированные, капсулированные, кристаллические формы БАД, обогащенные продукты питания, без длительного хранения экстрактов. Исключая продукты с высоким содержанием белка
2 % шавелевая кислота	То же, но возможно хранение экстрактов в течение 4...5 ч
3 % трихлоруксусная кислота	Для всех видов БАД и обогащенных продуктов питания, включая продукты с высоким содержанием белка
Смесь уксусной и метафосфорной кислот	То же
6 % метафосфорная кислота	* То же, возможно хранение экстракта в течение 4...5 ч

Приготовление экстрагирующего раствора. *Приготовление водного раствора соляной кислоты массовой концентрации 20 г/дм^3 (2%).* 47,5 см³ 36 %-ной соляной кислоты доводят до метки в 1000 см³ мерной колбе дистиллированной водой.

Приготовление водного раствора трихлоруксусной кислоты массовой концентрации 30 г/дм^3 (3%). 30 г кристаллической трихлоруксусной кислоты доводят до метки в 1000 см³ мерной колбе дистиллированной водой.

Приготовление водного раствора метафосфорной кислоты массовой концентрации 60 г/дм^3 . Взвешивают 60,00 г растертой в ступке метафосфорной кислоты на весах 4-го класса точности, растворяют без нагревания в 100...200 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см³, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и фильтруют. Раствор хранят при $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ не более 7 сут.

Приготовление водного раствора метафосфорной кислоты массовой концентрации 30 г/дм^3 . Необходимый для измерения объем водного раствора метафосфорной кислоты массовой концентрации 60 г/дм^3 смешивают с дистиллированной водой в соотношении 1:1. Раствор готовят непосредственно перед применением.

Приготовление водного раствора трилона Б (этилендиаминтетраацетат натрия) молярной концентрации $c = 0,05 \text{ моль/дм}^3$. Взвешивают 1,8 г трилона Б на весах 2 класса точности и растворяют в 100...300 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см³, доливая дистиллированную воду до метки.

Приготовление смеси водного раствора трилона Б (этилендиаминтетраацетат натрия) молярной концентрации $c = 0,05$ моль/дм³ и раствора метафосфорной кислоты массовой концентрации 60 г/дм³ или раствора трихлоруксусной кислоты массовой концентрации 30 г/дм³ (раствор осадителя). Отмеряют цилиндром 300 см³ водного раствора метафосфорной кислоты массовой концентрации 60 г/дм³ (или водного раствора трихлоруксусной кислоты массовой концентрации 30 г/дм³) и 300 см³ раствора трилона Б (этилендиаминтетраацетат натрия) молярной концентрации $c = 0,05$ моль/дм³ в коническую колбу объемом 750 см³ и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед применением.

Приготовление смеси уксусной и метафосфорной кислот. К раствору 15 г метафосфорной кислоты в 200 см³ дистиллированной воды добавляют 40 см³ ледяной уксусной кислоты и доводят дистиллированной водой до 500 см³. Хранят в склянке с притертой пробкой в холодильнике в течение 7 дней.

Приготовление стандартного раствора АК. Растворяют 0,1000 г (точная навеска) аскорбиновой кислоты, отвечающей требованиям ГФ XI, в мерной колбе емкостью 100 см³ в выбранном экстрагирующем растворе и доводят тем же раствором до метки, 10 см³ полученного раствора АК помещают в мерную колбу на 100 см³ и доводят до метки раствором, используемым в качестве экстрагирующего. Раствор готовят непосредственно перед применением.

Приготовление раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (раствор красителя) и определение его титра. Взвешивают 0,100 г 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия на весах 2 класса точности, растворяют, тщательно перемешивая, в 250 см³ свежекипяченой дистиллированной воды температурой $(90 \pm 5)^\circ\text{C}$ содержащей около 50 мг бикарбоната натрия.

После охлаждения раствора до $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ доводят до метки дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 500 см³, затем фильтруют через складчатый фильтр в склянку из темного стекла. Раствор хранят при $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ не более 1 месяца.

Определение титра. К 1 см³ стандартного раствора аскорбиновой кислоты добавляют 9 см³ выбранного экстрагирующего раствора и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до розового окрашивания, не исчезающего в течение 15...20 с (V_m). Таким же образом титруют 10 см³ экстрагирующего раствора (V_r). Поправку к титру раствора (T), в мг АК, эквивалентных 1 см³ раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, вычисляют по формуле:

$$T = \frac{K}{V_m - V_k},$$

где K — количество аскорбиновой кислоты в 1 см^3 стандартного раствора, мг.

Приготовление раствора ацетатного буфера с рН 4,0. Растворяют 30 г безводного уксуснокислого натрия в 70 см^3 дистиллированной воды и, добавляя ледяную уксусную кислоту (около 100 см^3), потенциометрически доводят рН до 4,0.

Приготовление раствора ацетатного буфера с рН 5,0. Растворяют 30 г безводного уксуснокислого натрия в 70 см^3 дистиллированной воды и, добавляя ледяную уксусную кислоту (около 50 см^3), потенциометрически доводят рН до 5,0.

Приготовление 1,0 М раствора соляной кислоты. $17,2 \text{ см}^3$ 36 %-ной соляной кислоты разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе емкостью на 200 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой.

Приготовление 1,0 М раствора ацетата натрия. 82,0 г безводного ацетата натрия растворяют в мерной колбе емкостью 1000 см^3 дистиллированной водой и доводят до метки.

Приготовление солянокислого буфера с рН 5,2. К 40 см^3 1,0 М раствора соляной кислоты приливают 200 см^3 1,0 М раствора ацетата натрия и доводят до метки дистиллированной водой в мерной колбе емкостью 1000 см^3 .

Экстрагирование. Для приготовления экстракта рассчитанную массу навески взвешивают с погрешностью $\pm 0,0001 \text{ г}$. Затем гомогенизируют ее с небольшим количеством выбранного экстрагирующего агента, после чего полученный гомогенат количественно переносят в мерную колбу или мерный цилиндр объемом $V_{\text{общ}}$, доводят до метки экстрагирующим агентом, тщательно перемешивают, настаивают 5...10 мин и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. Для жидких пищевых добавок необходимое количество материала отмеривают пипеткой и доводят до метки экстрагирующим агентом в соответствующей мерной колбе.

Визуальное титрование. Для определения аскорбиновой кислоты $1...10 \text{ см}^3$ экстракта с общим содержанием аскорбиновой кислоты около 0,1 мг вносят пипеткой в коническую колбу вместимостью 50 или 100 см^3 , доводят объем экстрагентом до 10 см^3 и титруют раствором 2,6-дихлор-фенолиндофенолята натрия до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 15...20 с. Аналогично титруют равный объем экстрагирующего агента (контроль на реактивы).

Обработка результатов измерения. Содержание аскорбиновой кислоты (X), выраженное в мг на 1 г пищевой добавки вычисляют по формуле:

$$X = \frac{T \cdot (V_m - V_k) \cdot V_{\text{общ}}}{V_{\text{пр}} m},$$

где T — титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, мг/см³; V_m — объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедший на титрование исследуемого раствора, см³; V_k — объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедший на контрольное испытание, см³.

Остальные обозначения см. выше.

Спектрофотометрическое определение витамина С в напитках

После дегазации и, если необходимо, фильтрования исследуемых напитков готовят три раствора, добавляя реагенты в следующей последовательности (табл. 5.4).

Таблица 5.4

Последовательность добавления реагентов при спектрофотометрическом определении витамина С, см³

Реагент	Раствор №1 (контроль на реактивы)	Раствор №2 (стандарт)	Раствор №3 (исследуе- мый)
Солянокислый буфер (рН 5,2)	5,0	4,5	4,5
Напиток	—	—	0,5
Стандартный раствор аскорбиновой кислоты	—	0,5	—
Раствор 2,6-дихлорфенолиндо-фенолята натрия	1,0		1,0

Измеряют поглощение фенолята (избытка) в пробах № 2...3 при $\lambda = 540$ нм. Содержание АК (X), выраженное в мг на 1 л напитка рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{K D_{1-3} V_{\text{общ}}}{D_{1-2} V_{\text{пр}}} = \frac{K D_{1-3} \cdot 1000}{D_{1-2} \cdot 0,5},$$

где K — количество АК в 0,5 см³ стандартного раствора, взятого на определение, мг; D_{1-3} — величина поглощения исследуемого раствора № 3 против поглощения фенолята в контроле на реактивы; $V_{\text{общ}}$ — общий объем исследуемого напитка,

обычно его принимают равным 1000 см^3 ; $D_{1,2}$ — величина поглощения стандартного раствора № 2 против поглощения фенолята в контроле на реактивы; $V_{\text{пр}}$ — объем исследуемого напитка, взятый для спектрофотометрирования, в данном случае — $0,5 \text{ см}^3$.

За окончательный результат определения принимают среднее арифметическое двух определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 3% от среднего арифметического.

Чувствительность — 3 мкг аскорбиновой кислоты в пробе.

Для одной партии буфера и одного и того же раствора 2,6-дихлорфенол-индофенолята натрия величину ($K/D_{1,2}$), характеризующую качество реактива Тильманса, можно определять один раз в течение одной — двух недель, считая ее постоянной.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение микроингредиентам, получившим название «витамины» и «витаминоподобные вещества».
2. Расскажите о принципах определения витаминов.
3. Какие способы определения витамина А и каротинов вам знакомы?
4. На чем основаны методы определения аскорбиновой кислоты в пищевых системах?

ПИЩЕВЫЕ КИСЛОТЫ

Пищевые кислоты представляют собой разнообразную по своим свойствам группу веществ органической и неорганической природы.

Органические пищевые кислоты содержатся в большинстве видов растительных пищевых объектов (ягодах, фруктах, овощах, листовой зелени), где они, наряду с сахарами и ароматическими соединениями, участвуют в формировании вкуса и аромата. Наиболее типичными в составе различных плодов и ягод являются лимонная и яблочная кислоты.

Основной органической кислотой молока и молочных продуктов является молочная, образование которой связано с биохимическим превращением молочного сахара лактозы.

Неорганические кислоты, такие как фосфорная, серная и соляная, присутствуют в помидорах, что является отличительной особенностью этого вида плодов.

Наличие пищевой кислоты в составе продукта может являться следствием ее преднамеренного введения в качестве технологической пищевой добавки с целью придания продукту характерных для него органолептических свойств, формирования присущей ему консистенции или повышения стабильности, обеспечивающей сохранение качества продукта в течение определенного времени (срока хранения).

Анализ кислотного состава пищевого продукта дает возможность подтвердить его натуральность, определить присутствие в нем добавок кислот или обнаружить его фальсификацию.

Определение общего содержания веществ, имеющих кислотный характер (определение потенциальной кислотности), основано на титровании этих веществ сильными основаниями, результаты которого представляют в соответствующих кислотных числах (в зависимости от условий титрования, характерных для конкретного пищевого продукта).

Для определения содержания органических кислот используют как стандартные, так и альтернативные методы контроля. Большинс-

тво органических кислот можно определить хроматографическими методами. К альтернативным относятся методы ферментативного анализа, отличительной особенностью которого является специфичность, обеспечивающая достоверность результатов, высокие чувствительность и точность.

6.1. ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Метод определения основан на переводе свободных органических кислот (яблочной, молочной, щавелевой, винной, лимонной) и их солей в летучие этиловые или метиловые эфиры с последующим определением их методом газожидкостной хроматографии.

Реактивы и материалы:

♦ Объекты исследований — промышленные образцы пищевых продуктов с различным содержанием органических кислот (табл. 6.1).

♦ Этерифицирующая смесь: свежеприготовленный 7 %-ный раствор хлористого водорода в этаноле (смешивают 4 объемные части спирта с 1 объемной частью концентрированной соляной кислоты).

- ♦ Адипиновая кислота (стандарт).
- ♦ Диэтиленгликольсукцинат.
- ♦ Сорбент — Хромосорб-*W*, 60...80 меш.
- ♦ Четыреххлористый углерод (или хлороформ).
- ♦ Гексан.
- ♦ 80 %-ный водный раствор этанола.
- ♦ Этанол.
- ♦ *o*-Фосфорная кислота.

Методика проведения анализа. Газохроматографический анализ включает три этапа: подготовку образца к анализу, подготовку хроматографической колонки, газохроматографическое определение.

Подготовка образца. Способ подготовки образца к анализу зависит от содержания в нем органических кислот и жира (табл. 6.1).

При анализе образцов с низким содержанием жира (подгруппы 1.1 и 1.2) навеску средней гомогенизированной пробы продукта взвешивают в соответствующем количестве (2...5 г — для образцов подгруппы 1.1 и 0,1...0,2 г — для образцов подгруппы 1.2) на аналитических весах с точностью до 0,0001 г в грушевидной колбе со шли-

Таблица 6.1

Характеристика объектов исследования

Группа пищевых продуктов	Подгруппа пищевых продуктов	Продукты	Навеска средней пробы
1. Сухие и пастообразные продукты	1.1. Продукты с низким содержанием жира (менее 0,1 %) и органических кислот	Мед, патока	2...5 г
	1.2. Продукты с низким содержанием жира (до 0,5 %) и высоким содержанием органических кислот	Повидло, варенье, джем, фруктовые и овощные порошки, пюре, неглазированные помадные массы, карамель, драже, сухофрукты	0,1...0,2 г
	1.3. Продукты с высоким содержанием жира и низким содержанием органических кислот	Сухие молочные смеси, мучные кондитерские изделия, зерно, крупы, хлеб, хлебобулочные изделия, мясо, рыба, яйцо-желток	10...20 г
	1.4. Продукты с высоким содержанием жира и органических кислот	Сыры, сметана, творог, майонез, орехи, карамель с жиросодержащими начинками	0,5...1,0 г
2. Жидкие пищевые продукты	2.1. Продукты с низким содержанием жира и органических кислот	Соки, пиво, квас, вино, безалкогольные напитки	2...10 см ³
	2.2. Продукты с низким содержанием жира (менее 0,5 %) и высоким содержанием органических кислот	Кисломолочные продукты	5...10 см ³
	2.3. Продукты с высоким содержанием жира (более 0,5 %) и низким содержанием органических кислот	Молоко	5...10 см ³

фом (жидкий продукт вносят с помощью пипетки), вносят адипиновую кислоту (стандарт) в количестве 2...5 мг, взвешенную на аналитических весах с точностью до 0,0001 г на полиэтиленовой пластинке, приливают 5,0 см³ этерифицирующей смеси и осуществляют процедуру этерификации. Для этого колбу с анализируемой смесью соединяют с обратным холодильником и выдерживают при

температуре 60 °С в течение 25...30 мин. По окончании процедуры этерификации к содержимому колбы приливают 1,0 см³ четыреххлористого углерода (или хлороформа), встряхивают в течение 30 с, добавляют 10 см³ дистиллированной воды, повторно встряхивают в течение 30 с, переносят в делительную воронку и выдерживают до полного расслоения. Для хроматографического определения используют нижний хлороформный слой.

При анализе образцов с высоким содержанием жира (подгруппы 1.3, 1.4) навеску средней гомогенизированной пробы продукта в соответствующем количестве (10...20 г — для образцов подгруппы 1.3 и 0,5...1,0 г — для образцов подгруппы 1.4) взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,0001 г в центрифужной пробирке, вносят взвешенную на аналитических весах адипиновую кислоту (2...5 мг) и проводят тщательное обезжиривание пробы путем трехкратной экстракции. Для этого к содержимому центрифужной пробирки трижды добавляют по 20 см³ гексана и проводят экстракцию с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин и отделением гексанового слоя. К осадку приливают 50 см³ 80 %-ного водного раствора этанола, выдерживают в течение 40...60 мин, отделяют экстракт, переносят его в круглодонную колбу и упаривают на роторном испарителе при 60 °С досуха.

К сухому остатку добавляют этерифицирующую смесь и осуществляют процедуру этерификации, описанную выше.

При анализе жидких образцов (подгруппы 2.1...2.3) перед процедурой этерификации образцы досуха упаривают на роторном испарителе при 60 °С (в случае затруднений при упаривании в колбу добавляют 1,0 см³ ацетона).

Пробу жидкого образца с высоким содержанием жира (подгруппа 2.3) перед упариванием предварительно обезжиривают. Для этого проводят трижды экстракцию гексаном (по 10 см³) с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин и отделением гексанового слоя. Гексановый слой переносят в грушевидную колбу и упаривают досуха на роторном испарителе при 60 °С.

К сухому остатку приливают 5 см³ этерифицирующей смеси и далее проводят процедуру этерификации.

Подготовка хроматографической колонки. Подготовка хроматографической колонки осуществляется специалистом.

Навеску инертного носителя — сорбента Хромосорб-*W* в количестве 50 г взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г в круглодонной колбе, приливают 200 см³ этанола, в котором пред-

варительно растворено 0,5 см³ *o*-фосфорной кислоты, тщательно перемешивают, выдерживают в течение 2...3 ч и спирт отгоняют на роторном испарителе при температуре 80 °С до сухого состояния сорбента. К высушенному сорбенту приливают 200 см³ хлороформа, в котором предварительно растворяют 7,5 г диэтиленгликольсукцината, и повторно высушивают на роторном испарителе до исчезновения запаха хлороформа. Заполняют 2 стеклянные насадочные колонки длиной 2...3 м приготовленным сорбентом, присоединяют колонки к хроматографу и проводят кондиционирование при постоянном давлении небольшим потоком газа-носителя (гелий, азот или водород) 2 ч при 80 °С, 2 ч при 120 °С, 4 ч при 180 °С, 8 ч при 200 °С.

Газохроматографическое определение. 2...3 мкл хлороформного раствора этиловых эфиров органических кислот с помощью микрошприца вводят в испаритель хроматографа и элюируют из колонки газом-носителем. Разделение проводят в следующем режиме: температура колонки программируется от 100 до 200 °С со скоростью 6...10 °С/мин, температура испарителя 220 °С, температура пламенно-ионизационного детектора 210 °С, расход газа-носителя 30...40 см³/мин.

Идентификацию индивидуальных этиловых эфиров проводят по временам удерживания этиловых эфиров органических кислот — метчиков и методом добавки.

Содержание отдельных органических кислот (в %) в образце определяют по формуле:

$$C = \frac{A_1 C_{\text{ст}} \cdot 100 \cdot K}{A_c C},$$

где C — содержание отдельной кислоты в навеске, %; K — поправочный коэффициент для данной кислоты; $C_{\text{ст}}$ — масса навески стандарта, мг; A_c — площадь пика стандарта, в относительных единицах; C — масса навески продукта, мг; A_1 — площадь пика данной кислоты, в относительных единицах.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое (\bar{X}) результатов двух параллельных определений, которое округляют до трехзначной цифры.

Относительное допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений по отношению к среднему арифметическому значению зависит от содержания отдельной кислоты в образце и составляет 20 % при ее содержании до 0,3 г в 100 г продукта и 10 % — при содержании свыше 0,3 г в 100 г продукта.

6.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 6.2.1

Исследование кислотного состава сухофруктов

Цель работы: идентификация и количественное определение органических кислот, входящих в состав сухофруктов.

Реактивы и материалы:

- ♦ Объекты исследований — образцы высушенных яблок и чернослива.
- ♦ Этерифицирующая смесь: свежеприготовленный 7%-ный раствор хлористого водорода в этаноле (смешивают 4 объемные части спирта с 1 объемной частью концентрированной соляной кислоты).
- ♦ Адипиновая кислота (стандарт).
- ♦ Хлороформ.
- ♦ Дистиллированная вода.

Методика проведения анализа. *Подготовка образца.* В грушевидной колбе со шлифом взвешивают на аналитических весах (с точностью до 0,0001 г) 0,1...0,2 г средней гомогенизированной пробы образца высушенных яблок (образец 1). Во второй колбе взвешивают примерно такое же количество средней гомогенизированной пробы образца высушенного чернослива (образец 2). В колбы с образцами продуктов вносят по 2,5...3,0 мг взвешенной на аналитических весах (с точностью до 0,0001 г) на полиэтиленовой пластинке адипиновой кислоты, используемой в качестве стандарта. Точные значения навесок образцов и стандарта заносят в таблицу (табл. 6.2) лабораторного журнала.

К содержимому колб приливают по 5,0 см³ этерифицирующей смеси. Каждую колбу соединяют с обратным холодильником и выдерживают при температуре 60 °С в течение 25...30 мин. Затем колбы охлаждают до комнатной температуры, в каждую приливают по 1,0 см³ хлороформа, встряхивают в течение 30 с, добавляют по 10 см³ дистиллированной воды, повторно встряхивают в течение 30 с, содержимое колб переносят в делительные воронки и выдерживают до полного расслоения. Для хроматографического определения используют нижний хлороформный слой.

Таблица 6.2
Навески образцов и стандарта для исследования кислотного состава сухофруктов

Образец	Масса навески, мг
Образец 1	
Образец 2	
Стандарт:	
в образце 1	
в образце 2	

Подготовка хроматографической колонки. Подготовка хроматографической колонки осуществляется специалистом.

Газохроматографическое определение. 2...3 мкл хлороформного раствора этиловых эфиров органических кислот анализируемого образца с помощью микрошприца вводят в испаритель хроматографа с подготовленной хроматографической колонкой и элюируют из колонки газом-носителем. Газохроматографический анализ проводят для каждого образца отдельно в следующем режиме: температура колонки программируется от 100 до 200 °С со скоростью 6...10 °С/мин, температура испарителя 220 °С, температура пламенно-ионизационного детектора 210 °С, расход газа-носителя 30...40 см³/мин.

Идентификацию индивидуальных этиловых эфиров проводят по временам удерживания этиловых эфиров органических кислот — метчиков (лимонной, вишней, яблочной, молочной, шавелевой) и методом добавки.

Содержание отдельных органических кислот (в %) в анализируемом образце определяют по формуле:

$$C = \frac{A_1 C_{ст} \cdot 100 \cdot K}{A_c C},$$

где C — содержание отдельной кислоты в навеске, %; K — поправочный коэффициент для данной кислоты; $C_{ст}$ — масса навески стандарта, мг; A_c — площадь пика стандарта, в относительных единицах; C — масса навески продукта, мг; A_1 — площадь пика данной кислоты, в относительных единицах.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое (X) результатов двух параллельных определений, которое округляют до трехзначной цифры. Результаты определений вносят в таблицу (табл. 6.3).

Таблица 6.3

Результаты анализа кислотного состава сухофруктов

Кислота	Образец 1		Образец 2	
	Площадь пика	Содержание кислоты, %	Площадь пика	Содержание кислоты, %

Лабораторная работа 6.2.2

Газохроматографическое определение яблочной, винной и лимонной кислот в меде и джеме

Цель работы: определение органических кислот в составе сладких пищевых продуктов с низким содержанием жиров.

Реактивы и материалы:

- ♦ Объекты исследований — промышленные образцы меда и джема.
- ♦ Этерифицирующая смесь: свежеприготовленный 7 %-ный раствор хлористого водорода в этаноле (смешивают 4 объемные части спирта с 1 объемной частью концентрированной соляной кислоты).
- ♦ Адипиновая кислота (стандарт).
- ♦ Хлороформ.
- ♦ Дистиллированная вода.

Методика проведения анализа. *Подготовка образца.* В грушевидной колбе со шлифом взвешивают на аналитических весах (с точностью до 0,0001 г) 3,0...3,5 г средней гомогенизированной пробы меда. Во второй такой же колбе взвешивают в тех же условиях 0,1...0,2 г средней гомогенизированной пробы промышленного образца джема. В колбы с образцами продуктов вносят по 2,5...3,0 мг взвешенной на аналитических весах (с точностью до 0,0001 г) на полиэтиленовой пластинке адипиновой кислоты, используемой в качестве стандарта. Точные значения навесок образцов и стандарта вносят в табл. 6.4.

Таблица 6.4

Результаты газохроматографического определения яблочной, винной и лимонной кислот в меде и джеме

Образец	Масса навески, мг	Площадь пика кислоты			Содержание кислоты, %		
		яблочной	винной	лимонной	яблочной	винной	лимонной
Стандарт:							
в меде							
в джеме							
Мед							
Джем							

К содержимому колб приливают по 5,0 см³ этерифицирующей смеси. Каждую колбу соединяют с обратным холодильником и выдерживают при температуре 60 °С в течение 25...30 мин. Затем колбы охлаждают до комнатной температуры, в каждую приливают по 1,0 см³ хлороформа, встряхивают в течение 30 с, добавляют по 10 см³ дистиллированной воды, повторно встряхивают в течение 30 с, содержимое колб переносят в делительные воронки и выдерживают до полного расслоения. Для хроматографического определения используют нижний хлороформный слой.

Подготовка хроматографической колонки. Подготовка хроматографической колонки осуществляется специалистом.

Газохроматографическое определение. 2...3 мкл хлороформного раствора этиловых эфиров органических кислот анализируемого образца с помощью микрошприца вводят в испаритель хроматографа с подготовленной хроматографической колонкой и элюируют из колонки газом-носителем. Газохроматографический анализ проводят для каждого образца отдельно в следующем режиме: температура колонки программируется от 100 до 200 °С со скоростью 6...10 °С/мин, температура испарителя 220 °С, температура пламенно-ионизационного детектора 210 °С, расход газа-носителя 30...40 см³/мин.

Идентификацию индивидуальных этиловых эфиров проводят по временам удерживания метчиков — этиловых эфиров яблочной, винной, лимонной кислот и методом добавки.

Содержание отдельных органических кислот (в %) в анализируемом образце определяют по формуле:

$$C = \frac{A_1 C_{\text{ст}} \cdot 100 \cdot K}{A_c C},$$

где C — содержание отдельной кислоты в навеске, %; K — поправочный коэффициент для данной кислоты; $C_{\text{ст}}$ — масса навески стандарта, мг; A_c — площадь пика стандарта, в относительных единицах; C — масса навески продукта (меда или джема), мг; A_1 — площадь пика данной кислоты, в относительных единицах.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое (X) результатов двух параллельных определений, которое округляют до трехзначной цифры. Результаты определений вносят в таблицу (табл. 6.4).

Лабораторная работа 6.2.3

Газохроматографическое определение молочной кислоты в молочных продуктах

Цель работы: определение содержания молочной кислоты в молочных продуктах.

Реактивы и материалы:

- ♦ Объекты исследований — промышленные образцы молока (содержание жира 0,5 %) и кефира (содержание жира 3,2 %).
- ♦ Этерифицирующая смесь: свежеприготовленный 7 %-ный раствор хлористого водорода в этаноле (смешивают 4 объемные

части спирта с 1 объемной частью концентрированной соляной кислоты).

- ♦ Адипиновая кислота (стандарт).
- ♦ Хлороформ.
- ♦ Гексан.
- ♦ Дистиллированная вода.

Методика проведения анализа. Подготовка образца. В грушевидную колбу со шлифом с помощью пипетки вносят 10 см^3 средней гомогенизированной пробы молока и взвешивают на аналитических весах (с точностью до $0,0001 \text{ г}$). В колбу с образцом молока вносят $2,5...3,0 \text{ мг}$ адипиновой кислоты (стандарта), взвешенной на аналитических весах с точностью до $0,0001 \text{ г}$ на полиэтиленовой пластинке. Точные значения навесок образца и стандарта вносят в табл. 6.5.

Таблица 6.5

**Результаты газохроматографического определения
молочной кислоты в молочных продуктах**

Образец	Масса навески, мг	Площадь пика молочной кислоты	Содержание молочной кислоты, %
Стандарт:			
в молоке			
в кефире			
Молоко			
Кефир			

Перед процедурой этерификации пробу молока досуха упаривают на роторном испарителе при 60°C (в случае затруднений при упаривании в колбу добавляют $1,0 \text{ см}^3$ ацетона).

Отмеренные с помощью пипетки 7 см^3 средней гомогенизированной пробы кефира взвешивают на аналитических весах с точностью до $0,0001 \text{ г}$ в центрифужной пробирке, в которую вносят также взвешенную на аналитических весах адипиновую кислоту ($2,5...3,0 \text{ мг}$). Точные значения навесок образца и стандарта вносят в табл. 6.5.

Пробу кефира перед упариванием предварительно обезжиривают путем трехкратной экстракции. Для этого к содержимому центрифужной пробирки трижды добавляют по 20 см^3 гексана и проводят экстракцию с последующим центрифугированием в течение 10 мин при

4000 об/мин и отделением гексанового слоя. Гексановый слой переносят в грушевидную колбу и упаривают досуха на роторном испарителе при 60 °С.

Для проведения процедуры этерификации к сухому остатку каждой колбы приливают по 5,0 см³ этерифицирующей смеси, колбы соединяют с обратными холодильниками и выдерживают при температуре 60 °С в течение 25...30 мин. Затем их охлаждают до комнатной температуры, в каждую приливают по 1,0 см³ хлороформа, встряхивают в течение 30 с, добавляют по 10 см³ дистиллированной воды, повторно встряхивают в течение 30 с, содержимое колб переносят в делительные воронки и выдерживают до полного расслоения. Для хроматографического определения используют нижний хлороформный слой.

Подготовка хроматографической колонки. Подготовка хроматографической колонки осуществляется специалистом.

Газохроматографическое определение. 2...3 мкл хлороформного раствора анализируемого образца с помощью микрошприца вводят в испаритель хроматографа с подготовленной хроматографической колонкой и элюируют из колонки газом-носителем. Газохроматографический анализ проводят для каждого образца отдельно в следующем режиме: температура колонки программируется от 100 до 200 °С со скоростью 6...10 °С/мин, температура испарителя 220 °С, температура пламенно-ионизационного детектора 210 °С, расход газа-носителя 30...40 см³/мин.

Идентификацию этилового эфира молочной кислоты проводят по времени удерживания метчика и методом добавки.

Содержание молочной кислоты (в %) в анализируемом образце (молоке или кефире) определяют по формуле:

$$C = \frac{A_1 C_{ст} \cdot 100 \cdot K}{A_c C},$$

где C — содержание молочной кислоты в навеске, %; K — поправочный коэффициент для молочной кислоты; $C_{ст}$ — масса навески стандарта, мг; A_c — площадь пика стандарта, в относительных единицах; C — масса навески продукта (молока или кефира), мг; A_1 — площадь пика молочной кислоты, в относительных единицах.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое (\bar{X}) результатов двух параллельных определений, которое округляют до трехзначной цифры. Результаты определений вносят в таблицу (табл. 6.5).

Контрольные вопросы

1. Какие кислоты входят в группу пищевых?
2. В состав каких пищевых объектов входят кислоты?
3. Сформулируйте основные цели применения кислот в качестве пищевых добавок.
4. Каким методом можно определить общее содержание веществ, имеющих кислотный характер?
5. В чем заключается метод хроматографического анализа пищевых кислот?
6. Можно ли считать достоверным анализ содержания молочной кислоты в продукте, если результаты двух параллельных определений составили 0,1 г/100 г и 0,3 г/100 г?

ФЕРМЕНТЫ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы, присутствующие в любой живой клетке, а следовательно, и в любом пищевом сырье растительного и животного происхождения.

Изучение ферментов, так же как белков, начинается с их выделения и очистки.

В зависимости от задачи, которая стоит перед исследователем и перед технологом, тем, кто работает с ферментами, выбирается тот или иной подход в этой работе. Имеется в виду следующее: если необходимо выделить и охарактеризовать фермент из какого-либо биологического объекта, пищевого сырья, следует применить либо известные схемы выделения и очистки, либо разработать оптимальную схему для данного фермента, варьируя и испытывая различные сочетания основных этапов выделения и очистки ферментов (белков): экстракцию, различные режимы осаждения, гель-хроматографию, ионнообменную хроматографию, аффинную хроматографию, различные типы электрофоретического разделения белков.

При этом на каждом этапе выделения и очистки следует характеризовать ферментный препарат по ферментативной активности и содержанию белка. В этом случае определение ферментативной активности (определение начальной скорости ферментативной реакции — V_0) проводят с использованием стандартного субстрата; выявляют оптимальные значения рН и температуры. Все дальнейшие исследования проводят при насыщающей концентрации субстрата, оптимуме температуры и рН. Изучение влияния специфических активаторов и ингибиторов позволяет в этом случае получить ценные сведения о строении активного центра и возможном механизме каталитического действия.

Здесь необходимо подчеркнуть важность тщательного методического подхода при работе с ферментами. Не следует жалеть времени и усилий на выбор режима экстракции (продолжительность, температу-

ра, экстрагент, тип экстракции — исчерпывающая или нет), выбор методики определения активности, ее отработку и возможную модификацию для данного конкретного объекта исследования. Кроме того, работа с ферментами различной степени очистки также имеет свои особенности, свою специфику: они обладают разной рН- и термостабильностью и, помимо этого, могут по-разному реагировать на воздействие различных факторов.

При выделении ферментов из какого-либо биологического материала, прежде всего, следует заботиться о том, что бы в процессе выделения ферментный препарат не потерял свою нативную конформацию. С целью предотвращения процесса денатурации при выделении фермента, независимо от способов выделения, следует придерживаться следующих общих принципов:

1. По возможности низкая температура: 2...4 °С (лучше — в холодной комнате).
2. рН, оптимальный для данного ферментного белка.
3. Добавление ЭДТА, с целью связывания ионов тяжелых металлов.
4. Низкий уровень окислительно-восстановительного потенциала (поддерживается с помощью меркаптоэтанола или дитиотрейтола).
5. По возможности наиболее высокая концентрация выделяемого белка.

Если задача формулируется по-другому, а именно: каким образом будет вести себя данный фермент (ферментный препарат) в конкретном режиме определенной пищевой технологии, то необходимо проводить исследование ферментативного действия при условиях данного технологического процесса (концентрация субстрата, длительность, рН, температура, влажность), а также изучить влияние различных компонентов пищевого сырья и используемых добавок на активность фермента с целью определить возможность и способы влияния на ферментативный процесс в желаемом направлении.

Ферментные препараты, выпускаемые промышленностью, находят все большее применение в различных отраслях пищевой промышленности. Основными из них являются: бактериальные и грибные протеиназы, глюкоамилазы, бактериальные и грибные α -амилазы, глюкоизомераза, пектолитические, целлюлолитические и гемицелюлазные ферменты, молокосвертывающая кислая протеиназа, β -галактозидаза, липазы, липоксигеназы, β -фруктофуранозидаза, декстриназы и некоторые другие.

7.1. СПОСОБЫ ВЫРАЖЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Любой ферментный препарат должен быть охарактеризован по ферментативной активности. Комиссия по ферментам Международного Биохимического Союза рекомендует использовать следующие понятия и выражения единиц ферментативной активности ферментов:

- ♦ **Стандартная единица фермента** — это такое количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля данного субстрата за одну минуту при заданных условиях. Стандартная единица фермента обозначается буквой E (от русского слова «единица») или буквой U (от английского слова «unit»).

- ♦ **Удельная активность** — это число единиц (E или U), отнесенное к одному миллиграмму белка в ферментном препарате. Количество белка в ферментном препарате может быть определено любым известным методом определения белка (метод Кьельдаля, метод Лоури и др.).

- ♦ **Молекулярная активность** — число молекул данного субстрата или эквивалентов затронутых групп, превращаемых за одну минуту одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата. Для определения молекулярной активности фермента нужно знать его молекулярную массу.

- ♦ **Катал** — каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью равной 1 молю в секунду в заданной системе измерения активности. Каталитическая активность в 1 катал (кат) при практическом применении оказывается слишком большой величиной, поэтому в большинстве случаев каталитические активности выражают в микрокаталах (мккат), нанокаталах (нкат) или пикокаталах (пкат). Стандартная единица фермента находится с каталом в следующем соотношении $1 E (U) = 16,67 \text{ нкат}$.

7.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Методы измерения активности ферментов делят на две группы: одни основаны на остановке реакции через определенные промежутки времени, в других прирост продукта или убыль субстрата регистрируется непрерывно.

В первом случае возможны два варианта: а) из реакционной смеси периодически, через определенные интервалы времени, отбирают пробы, в которых реакция быстро останавливается путем быстрой инактивации фермента; б) готовят серию параллельных проб, останавливая реакцию в них через различные интервалы времени.

Методы непрерывной регистрации ферментативной активности часто основаны на том, что в ходе реакции происходит убыль или нарастание количества вещества, обладающего характерными спектральными свойствами. Например, таким образом измеряют активность дегидрогеназ, использующих НАДН и НАДФН.

Внимание исследователей и технологов, перерабатывающих растительное сырье, привлекают ферменты класса оксидоредуктаз и гидролаз, поскольку переработка пищевого сырья связана с разрушением клеточной структуры, а в системах с разрушенной клеточной структурой именно окислительные и гидролитические процессы протекают с наибольшей интенсивностью.

7.2.1. Определение активности алкогольдегидрогеназы

Алкогольдегидрогеназа (Н.Ф. 1.1.1.1) катализирует конечную реакцию брожения — восстановление (обратимое) уксусного альдегида в этиловый спирт. Фермент является НАД-зависимой дегидрогеназой и относится к классу оксидоредуктаз. Обнаружен во многих тканях животных, растений, а также у микроорганизмов. Пекарские дрожжи содержат активную алкогольдегидрогеназу, ее молекулярная масса около 150 000 Дальтон.

Определение активности алкогольдегидрогеназы основано на окислении этилового спирта, которое сопровождается восстановлением НАД (моль на моль), что регистрируют спектофотометрически по увеличению оптической плотности при 340 нм.

Реактивы и материалы:

- ♦ 0,06 М натрий-пирофосфатный буфер рН 8,5.
- ♦ 3 М раствор этилового спирта.
- ♦ 0,0015 М раствор НАД, рН 6,0 (может несколько дней храниться на холоде).
- ♦ Алкогольдегидрогеназа — 1 Е/см³ свежеприготовленный раствор на 0,1 %-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в 0,01 М калий фосфатном буфере рН 7,5.

Методика проведения анализа. В спектрометрическую кювету помещают реакционную смесь, содержащую 2,2 см³ Н₂О, 0,5 см³ буфера рН 8,5, 0,1 см³ этанола и 0,1 см³ НАД. Реакцию начинают добавлением 0,1 см³ раствора алькогольдегидрогеназы. Содержимое кюветы быстро перемешивают и измеряют увеличение оптической плотности в течение 45 секунд. Измерение проводят против контрольной кюветы, содержащей те же компоненты, только вместо субстрата добавляют соответствующее количество воды.

Коэффициент молярного поглощения НАДН (НАДФН) при 340 нм равен $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. При расчетах исходят из того, что при окислении — восстановлении 1 мкмоль кофермента при 340 нм в кювете с расстоянием между рабочими гранями 1 см в 1 см³ реакционной смеси оптическая плотность меняется на 6,22 ед. Количество определяемого вещества в пробе (в микромолях) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{\Delta A_{340} V}{6,22},$$

где ΔA_{340} — изменение оптической плотности реакционной смеси; V — объем пробы, в которой протекает реакция, в см³.

7.2.2. Определение активности липоксигеназы по модифицированному методу Г. Г. Дубцова и М. П. Попова

Фермент липоксигеназа (Н.Ф. 1.13.1.13) катализирует окисление высокомолекулярных ненасыщенных жирных кислот — линолевой, линоленовой, арахидоновой — до перекисей и гидроперекисей.

Метод определения активности липоксигеназы основан на учете образующихся в результате реакции перекисных соединений по характерному поглощению при 234 нм. В качестве субстрата при этом используют смесь жирных кислот, выделенную из подсолнечного масла.

Реактивы и материалы:

- ♦ Смесь жирных кислот: 50 г рафинированного подсолнечного масла растворяют при нагревании в 50 см³ 96 %-ного этилового спирта. Отдельно растворяют при нагревании 15 г едкого калия в 10 см³ воды и затем добавляют 50 см³ 96 %-ного этилового спирта. Оба раствора нагревают до кипения и смешивают (щелочной раствор вливают в масло). Затем спирт отгоняют и в колбу приливают избыток 10 %-ного раствора HCl. Смесь перемешивают и нагревают до полно-

го разложения мыла. Жирные кислоты отделяют на делительной воронке и промывают несколько раз горячей водой до полного удаления остатков минеральной кислоты.

♦ Гомогенные субстраты: 0,5 см³ Твин-40 вносят в 10 см³ боратного буфера рН 9,0. Затем по каплям добавляют 0,5 см³ смеси жирных кислот, интенсивно перемешивают и добавляют 1,3 см³ раствора 1 н. NaOH. Раствор доводят до 100 см³ боратым буфером и в таком виде субстрат можно хранить в холодильнике в течение недели. Для определения активности липоксигеназы в сое используют субстрат, приготовленный по вышеуказанной методике (рН 9,0). При определении активности липоксигеназы в пшенице субстрат разбавляют 2,5 частями воды и подкисляют до 7,0.

♦ 96 %-ный этиловый спирт.

Методика проведения анализа. В коническую колбу вносят 10 см³ субстрата и 1 см³ фермента. Смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем из инкубационной смеси отбирают 0,5 см³ и переносят в пробирку, содержащую 4,5 см³ 96 %-ного этилового спирта. В этой пробе определяют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 234 нм. Контролем служит проба, отобранная от субстрата, к которому вместо фермента добавляют 1 см³ воды.

Активность липоксигеназы выражается как изменение оптической плотности, вызываемое 1 мг ферментного белка за 1 час при данных условиях:

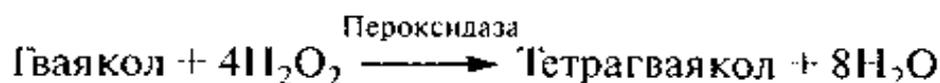
$$\text{Активность липогеназы} = \frac{(A_{\text{опыт}} - A_{\text{контроль}}) \cdot 60}{20(\text{мг белка в ферментном препарате})}$$

7.2.3. Определение активности пероксидазы (по Бояркину)

Пероксидаза (Н.Ф. 1.11.1.7) — катализирует реакцию окисления различных соединений пероксидом водорода. Пероксидаза — двухкомпонентный фермент, его простетическая группа содержит железо, соединенное с остатками четырех пиррольных колец в виде гематина. Фермент стабилен в широком диапазоне рН, оптимум активности при рН 7,0.

Спектрофотометрический метод определения активности пероксидазы основан на определении начальной скорости ферментативной

реакции расщепления пероксида водорода на кислород и воду и окислении выделившимся кислородом гваякола.



За единицу активности пероксидазы принимают такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 мкмоль пероксида водорода за 1 минуту при температуре 25 °С.

Реактивы и материалы:

- ♦ 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,0.
- ♦ 0,02 М раствор гваякола.
- ♦ 0,008 М раствор H_2O_2 (0,1 см³ 30 %-ного раствора пероксида водорода разводят в 120 см³ охлажденной дистиллированной воды).

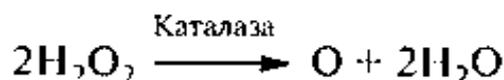
Методика проведения анализа. В две пробирки вносят по 2,8 см³ 0,1 М раствора фосфатного буфера, 0,05 см³ раствора гваякола и 0,1 см³ ферментного раствора. Смесь перемешивают, выдерживают при температуре 25 °С 10 минут и приливают 0,05 см³ раствора пероксида водорода. Измерение оптической плотности при 436 нм в первой пробирке проводят сразу после добавления пероксида водорода; во второй пробирке — через 1 минуту после внесения пероксида водорода; для этого используют кювету с толщиной слоя 10 мм.

Активность пероксидазы выражают как отношение разницы оптической плотности между контрольным и опытным определениями к количеству белка (в мг) в ферментном препарате, с учетом разведения:

$$\text{Активность пероксидазы} = \frac{(A_{\text{опыт}} - A_{\text{контроль}}) \cdot 60}{\text{мг белка в ферментном препарате}}$$

7.2.4. Определение активности каталазы (по Баху и Опарину)

Каталаза (Н.Ф. 1.11.1.6) — катализирует реакцию отнятия водорода от одной молекулы пероксида водорода и его переноса на вторую молекулу H_2O_2 с образованием воды и кислорода:



Сущность метода заключается в том, что избыток пероксида водорода после проведения ферментативной реакции оттитровывают 0,1 н. раствором перманганата калия в кислой среде.

За единицу каталазной активности принимают такое количество фермента, под действием которого происходит разложение 1 г пероксида водорода за 1 минуту при данных условиях эксперимента.

Реактивы и материалы:

- ♦ 1 %-ный раствор H_2O_2 .
- ♦ 0,1 н. раствор марганцово-кислого калия.
- ♦ 10 %-ный раствор серной кислоты.

Методика проведения анализа. В коническую колбу вместимостью 100 см^3 вносят 7 см^3 дистиллированной воды и 1 см^3 ферментного раствора, перемешивают и выдерживают 5 минут при комнатной температуре. Одновременно готовят контрольный раствор, для этого в такую же колбу вносят 7 см^3 дистиллированной воды и 1 см^3 ферментного раствора, предварительно инактивированного кипячением. Затем в обе колбы добавляют по 2 см^3 1 %-ного раствора H_2O_2 и содержимое инкубируют 30 минут при комнатной температуре. Для остановки ферментативной реакции в обе колбы добавляют по 5 см^3 10 %-ного раствора серной кислоты. Содержимое колб перемешивают и титруют 0,1 н. раствором марганцово-кислого калия до появления стойкого розового окрашивания.

О каталазной активности судят по разнице объемов 0,1 н. раствора KMnO_4 , пошедших на титрование контрольной и опытной проб, умноженной на коэффициент 1,7.

$$T = \frac{0,1 \cdot 17}{1000} = 0,0017 \text{ г/см}^3, \text{ или } 1,7 \text{ мг/см}^3,$$

где 17 — молярная масса эквивалента H_2O_2 , г/моль.

7.2.5. Определение активности амилаз колориметрическим методом

Колориметрический метод основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза крахмала, которую устанавливают по количеству прогидролизованного крахмала в процессе колориметрической реакции с йодом.

Реактивы и материалы:

- ♦ Крахмальный клейстер — 2 мг/см^3 .
- ♦ Фосфатно-цитратный буфер pH 5,6.
- ♦ Рабочий раствор йода на 0,1 н. HCl .

Методика проведения анализа. В качестве стандартного субстрата используют растворимый крахмал. Инкубационная смесь состоит из

5 см³ раствора крахмала с концентрацией 2 мг/см³, 4 см³ фосфатно-цитратного буфера pH 5,6 и 1 см³ фермента.

Преинкубацию субстрата и фермента проводят при температуре 40 °С в течение 10 минут, после чего заданное количество фермента вносят в субстрат. Отбор проб проводят через 0 и 10 минут от начала внесения фермента. За это время реакция протекает с начальной скоростью. Отобранные пробы сразу переносят в заранее приготовленные пробирки с 2 см³ рабочего раствора йода на 0,1 н. HCl. Оптическую плотность комплекса «крахмал — йод» измеряют на фотоэлектроколориметре КФК-2МП при длине волны 590 нм. Степень гидролиза крахмала определяют по калибровочной кривой (рис. 7.1).

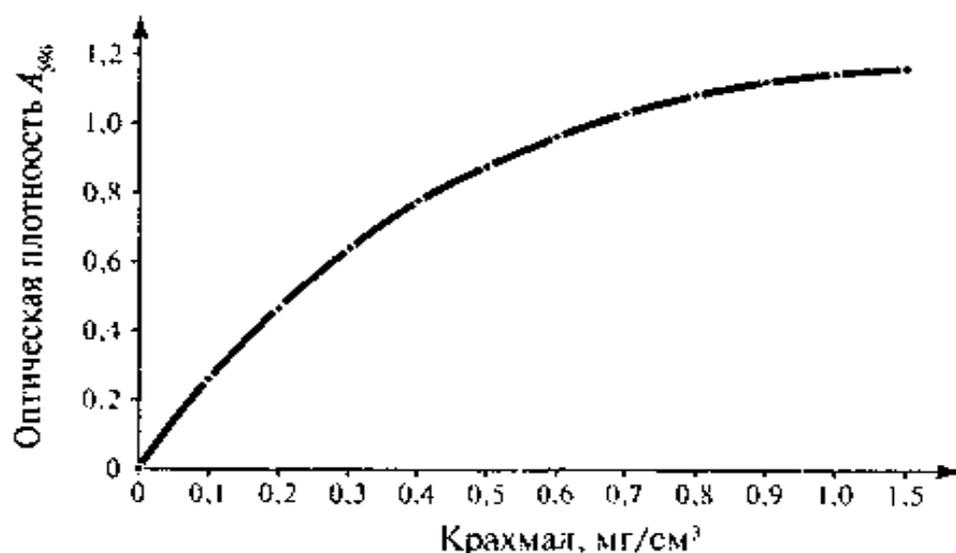


Рис. 7.1. Калибровочная кривая для определения крахмала

Удельную активность амилаз выражают как отношение количества прогидролизованного крахмала в миллиграммах к миллиграммам белка в ферментном препарате.

7.2.6. Определение активности протеаз модифицированным методом Ансона

В основу метода положено определение продуктов расщепления стандартного белка, неосаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и поглощающих при длине волны 280 нм.

Метод обладает высокой чувствительностью, что важно при исследовании протеолитических ферментов семян, имеющих низкую активность.

Реактивы и материалы:

- ♦ 0,5 % раствор бычьего сывороточного альбумина или гемоглобина.
- ♦ Фосфатно-цитратный буфер с рН 3,8...4,0 для кислых протеиназ; рН 6,5...7,0 для нейтральных протеиназ; рН 8,0 для щелочных протеиназ.
- ♦ 10 %-ный раствор ТХУ.

Методика проведения анализа. В качестве стандартного субстрата при определении протеолитической активности используют бычий сывороточный альбумин или гемоглобин. Инкубационная смесь состоит из 10 см³ 0,5 %-ного раствора альбумина, 8 см³ 0,1 М фосфатно-цитратного буфера с соответствующим рН и 2 см³ фермента.

Предынкубацию субстрата и фермента проводят при температуре 40 °С в течение 10 минут, после чего в субстрат вносят фермент и отбирают пробы по 2,0 см³ сразу после внесения фермента и через промежуток времени, установленный для протеиназ по начальной скорости реакции (20 минут).

Отобранные пробы переносят в пробирки, содержащие равное количество 10 % ТХУ, содержимое пробирок перемешивают и термостатируют 20 минут при 40 °С. Образующийся осадок отфильтровывают и в фильтрате определяют количество неосаждаемых ТХУ продуктов гидролиза белка по поглощению при 280 нм на спектрофотометре.

Активность ферментов выражают в единицах шкалы прибора, как разницу оптической плотности между нулевой и двадцатиминутной пробой. Удельную активность протеаз выражают как отношение активности фермента к количеству белка в ферментном препарате в миллиграммах.

7.2.7. Определение активности эндоглюконаз фотоколориметрическим методом с применением реактива Шомадьи — Нельсона

Метод основан на гидролитическом расщеплении растворимой формы целлюлозы — натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и определения образовавшихся углеводов с применением реактива Шомадьи — Нельсона.

За единицу эндоглюконазной активности в данном методе принимают такое количество фермента, которое катализирует гидро-

лиз целлюлозы за 1 час с образованием 1 мг глюкозы при данных условиях.

Реактивы и материалы:

- ♦ Субстрат — 1 %-ный раствор Na-КМЦ в 0,1 М ацетатном буфере pH 4,7.
- ♦ Реактив Шомадьи.
- ♦ Реактив Нельсона.

Методика проведения анализа. В пробирки вносят 0,5 см³ субстрата и прогревают в ультратермостате 10 минут при 45 °С. Затем вносят 0,5 см³ ферментного раствора и смесь инкубируют в течение 30 минут при 45 °С. После этого смесь быстро охлаждают и проводят определение образовавшихся восстанавливающих сахаров по методу Шомадьи — Нельсона (см. п. 2.1.3, с. 51).

Контролем служат две пробы: на субстрат и на фермент. Первая содержит 0,5 см³ субстрата и 0,5 см³ дистиллированной воды, вторая — 0,5 см³ субстрата и 0,5 см³ ферментного раствора, предварительно инактивированного 10-минутным кипячением.

Интенсивность образовавшейся окраски измеряют при ФЭКе при 590 нм против контроля на реактивы.

Активность эндоглюконазы выражают в миллиграммах редуцирующих сахаров (в пересчете на глюкозу), содержание которых определяют по калибровочной кривой (см. п. 2.1.3, с. 51). При расчете учитывают разведение ферментного препарата:

$$\text{Активность эндоглюконазы} = a \cdot 2 \cdot n,$$

где a — количество образовавшейся глюкозы, мг/см³; 2 — коэффициент перевода 30 мин в часы; n — коэффициент разведения ферментного препарата.

7.2.8. Определение активности эндоглюконаз фотоколориметрическим методом с применением антронового реактива

Метод основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза субстрата (раствор Na-КМЦ), которую устанавливают по количеству образовавшихся спирторастворимых сахаров, определяемых колориметрически с помощью антронового реактива. Принцип антронового метода рассмотрен в п. 2.1.9, с. 63.

Методика проведения анализа. 5 см³ субстрата помещают в пробирку вместимостью 20 см³, добавляют 3 см³ исследуемого ферментного

раствора, перемешивают и инкубируют при 50 °С в течение 1 часа. Затем пробирку со смесью помещают на 5...10 минут в кипящую водяную баню для инактивации фермента, после чего быстро охлаждают до комнатной температуры.

В полученном гидролизате определяют количество спирторастворимых углеводов с применением колориметрического антронового метода (п. 2.1.9, с. 63). Эндоглюконазную активность рассчитывают по уравнению:

$$\text{Активность эндоглюконазы} = \frac{(0,71 \cdot C + 0,76) \cdot 10^3}{\text{мг белка в ферментном препарате}},$$

где C — количество спирторастворимых углеводов, образовавшихся в ходе ферментативной реакции; 0,71 и 0,76 — постоянные коэффициенты, полученные экспериментально; 10^3 — коэффициент перевода миллиграммов в граммы.

7.2.9. Определение активности пектинэстеразы

Пектинэстераза (Н.Ф. 3.1.1.11) катализирует гидролиз сложноэфирных связей в молекуле пектина с образованием полигалактуроновой кислоты и метилового спирта.

Метод определения пектинэстеразной активности основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза сложноэфирных связей и последующим определением свободных карбоксильных групп титриметрическим способом.

За единицу активности пектинэстеразы принимают такое количество фермента, которое катализирует при 30 °С и оптимальном рН, отщепление 1 мкмоль эквивалентов метоксильных групп в молекуле пектина за 1 минуту.

Пектинэстеразная активность зависит от степени этерификации пектина. Сравнимые результаты можно получить лишь при пересчете полученных данных на субстрат со 100 % степенью метоксирования.

В принятых условиях анализа количество расщепленных сложноэфирных связей прямо пропорционально количеству фермента при условии, что степень гидролиза не превышает 20 %.

Реактивы и материалы:

- ♦ Субстрат — 1 %-ный раствор пектина.
- ♦ 0,1 н. раствор гидроксида натрия.

Методика проведения анализа. В четыре стакана вместимостью 50 см³ помещают по 20 см³ субстрата, накрывают часовым стеклом и

ставят в термостат с температурой 30 °С. Через 15 минут в два стакана приливают по 10 см³ ферментного раствора, в два другие — по 10 см³ инактивированного фермента (инактивацию проводят кипячением раствора фермента). Общий объем реакционной смеси всегда должен быть равен 30 см³. Ферментативную реакцию ведут в течение 1 часа, после чего пробы вынимают из термостата и при помощи потенциометра быстро титруют опытные и контрольные растворы 0,1 н. NaOH из микробюретки.

Пектинэстеразную активность (ед./г или ед./см³) вычисляют по уравнению:

$$\text{Активность пектинэстеразы} = \frac{100 \cdot (V_0 - V_k) \cdot 100}{t \cdot a \cdot x},$$

где 100 — число микроэквивалентов отщепленных метоксильных групп; соответствующее 1 см³ 0,1 н. раствору NaOH; V_0 и V_k — количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование контрольного и опытного образцов, см³; 100 — степень этерификации пектина; a — количество фермента в г; x — степень этерификации пектина.

7.2.10. Титриметрический метод определения липазы зерновых культур

Липаза (Н.Ф. 3.1.1.3) катализирует гидролиз жиров с образованием глицерина и смеси высших жирных кислот.

Липазную активность определяют по начальной скорости ферментативной реакции гидролиза триглицеридов растительного масла, которую рассчитывают по количеству образовавшихся жирных кислот титриметрическим методом. В качестве субстрата используют эмульсию, содержащую 5 % подсолнечного масла и 2 % α -моностеарата глицерина.

Липазную активность выражают количеством 0,01 н. раствора гидроксида калия (см³), пошедшего на титрование жирных кислот, образовавшихся под действием фермента выделенного из 1 г зерна, на субстрат в течение 1 часа при 40 °С и оптимальном значении pH.

Реактивы и материалы:

- ♦ 0,01 н. раствор КОН.
- ♦ Фосфатный буферный раствор с pH: 7,4 — для пшеницы; 6,9 — для ячменя; 7,3 — для тритикале.
- ♦ 96 %-ный этиловый спирт.

- ♦ Индикатор — фенолфталеин.

Методика проведения анализа. Из средней пробы тонкоразмолотого зерна отбирают навеску и помещают в колбу, в которую добавляют соответствующий буфер в соотношении 1 : 4. Настаивают при непрерывном перемешивании на качалке в течение 30 минут и центрифугируют содержимое колбы при 5000 об/мин в течение 5 минут. Полученную ферментную вытяжку используют для анализа.

Субстрат готовят следующим образом: в стакан лабораторной центрифуги вносят 5 см³ подсолнечного масла и 2 г α-моностеарата глицерина. К смеси добавляют 100 см³ дистиллированной воды, нагревают до 75 °С, центрифугируют в течение 5 минут при 5000 об/мин и охлаждают при постоянном перемешивании. Супернатант используют для анализа.

Инкубационная смесь состоит из 12 см³ субстрата и 4 см³ ферментной вытяжки. Ферментативную реакцию ведут при 40 °С в ультратермостате в течение 2 часов и останавливают добавлением 20 см³ спирта. Для контроля к 4 см³ ферментной вытяжки приливают 20 см³ спирта, а затем после перемешивания 12 см³ субстрата.

Содержимое контрольных и опытных проб титруют 0,01 н. раствором КОН.

Активность липазы (ед./г) рассчитывают по разности данных титрования гидроксидом калия контрольных и опытных проб:

$$\text{Активность липазы} = \frac{(V_0 - V_K) \cdot 1}{a},$$

где V_0 и V_K — количество 0,01 н. раствора КОН, пошедшего на титрование контрольной и опытной проб, см³; a — количество зерна, соответствующее количеству фермента в инкубационной смеси, г;

7.3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 7.3.1

Амилазы и их ингибиторы

Амилазы широко распространены в природе и играют важную роль во многих технологических процессах. Некоторые особенности взаимодействия амилаз с крахмалом и с ингибиторами раз-

ного происхождения можно проследить на простых модельных системах. Для этого удобно использовать характерную реакцию крахмала с йодом. По мере расщепления крахмала амилазами снижается интенсивность окраски комплекса «крахмал — йод». Ослабление окраски может быть зафиксировано путем измерения ее на ФЭКе.

Цель работы: изучить изменение активности амилаз при разных сроках прорастания зерна и влияние на амилалитическую активность солода различных ингибиторов.

Реактивы и материалы:

- ♦ Рабочий раствор крахмала — 2 мг/см^3 .
- ♦ Раствор йода на $0,1 \text{ н. HCl}$.
- ♦ Растворы амилаз — $0,5 \text{ мг/см}^3$, солодовая вытяжка.
- ♦ Картофельный сок, свежеприготовленный.
- ♦ CuSO_4 — $0,5\%$ -ный раствор.

Работа проводится в несколько этапов.

1. Выбор светофильтра

Таблица 7.1
Данные для построения графика
изменения оптической плотности
от длины волны

Длина волны, нм	Цвет светофильтра	Оптическая плотность (A)
380		
415		
500		
530		
600		
630		
720		

В пробирке смешивают 2 см^3 раствора крахмала с концентрацией $0,2 \text{ мг/см}^3$ (рабочий раствор крахмала разводят в 10 раз) и 2 см^3 раствора йода. На ФЭКе измеряют оптическую плотность комплекса «крахмал — йод» при всех светофильтрах. Результаты записывают в табл. 7.1 и строят график изменения оптической плотности при разных длинах волн. Для дальнейшей работы выбирают светофильтр, соответствующий максимальному поглощению (табл. 7.1).

2. Построение калибровочной кривой для определения крахмала

Для построения калибровочной кривой используют рабочий раствор крахмала с концентрацией $2,0 \text{ мг/см}^3$. Из него готовят растворы с меньшей концентрацией по схеме:

Раствор	Содержание крахмала, мг/см ³
Рабочий раствор крахмала	2,0
7,5 см ³ (I) + 2,5 см ³ H ₂ O	1,5
5,0 см ³ (I) + 5,0 см ³ H ₂ O	1,0
4,5 см ³ (I) + 5,5 см ³ H ₂ O	0,9
4,0 см ³ (I) + 6,0 см ³ H ₂ O	0,8
3,5 см ³ (I) + 6,5 см ³ H ₂ O	0,7
3,0 см ³ (I) + 7,0 см ³ H ₂ O	0,6
2,5 см ³ (I) + 7,5 см ³ H ₂ O	0,5
2,0 см ³ (I) + 8,0 см ³ H ₂ O	0,4
1,5 см ³ (I) + 8,5 см ³ H ₂ O	0,3
1,0 см ³ (I) + 9,0 см ³ H ₂ O	0,2
0,5 см ³ (I) + 9,5 см ³ H ₂ O	0,1

Содержимое пробирок перемешивают, из каждой пробирки отбирают по 2 см³ раствора и переносят в пробирки с 2 см³ раствора йода. В качестве контроля используют пробу, в которой вместо раствора крахмала взята дистиллированная вода. Оптическую плотность комплекса «крахмал — йод» измеряют на ФЭКе при выбранном светофильтре. Измерения начинают с наименее окрашенных проб, последовательно переходя к пробам с более интенсивной окраской. Все замеры дублируются 2...3 раза. Полученные результаты вносят в табл. 7.2.

Таблица 7.2

Данные для построения калибровочной кривой

Крахмал, мг/см ³	Оптическая плотность (A)	Крахмал, мг/см ³	Оптическая плотность (A)
0,1		0,7	
0,2		0,8	
0,3		0,9	
0,4		1,0	
0,5		1,5	
0,6		2,0	

По полученным данным строят калибровочную кривую в координатах: «оптическая плотность — концентрация крахмала, мг/см³», используя при этом все полученные результаты.

3. Определение активности амилаз

В работе могут быть использованы препараты амилаз различного происхождения (солодовые амилазы, амилазы микробного происхождения).

При работе с солодовыми амилазами готовят солодовую вытяжку в соотношении 1 : 20.

Для этого к 2,5 г размолотого солода добавляют 50 мл дистиллированной воды, интенсивно перемешивают в течение 3 мин, затем центрифугируют и надосадочную жидкость используют для определения активности амилаз. Работа проводится с разными концентрациями фермента, для чего исходный раствор разводят в 5, 10, 20 и 50 раз.

Методика проведения анализа. В пробирку вносят 5 см³ раствора крахмала (2 мг/см³), 4 см³ воды и 1 см³ фермента. Содержимое пробирок быстро перемешивают и отбирают пробы по 2 см³ через 0, 5, 10, 15 и 20 мин после внесения фермента. Каждую отобранную пробу сразу же переносят в заранее приготовленные пробирки с 2 см³ раствора йода на 0,1 н. HCl. Измеряют оптическую плотность комплекса «крахмал — йод» на ФЭКе при выбранном светофилт্রে. Интервалы времени между отборами проб могут быть сокращены или увеличены в зависимости от интенсивности гидролиза крахмала. Полученные данные вносят в табл. 7.3. По калибровочной кривой определяют степень гидролиза крахмала.

Таблица 7.3

Результаты определения активности амилаз

Вариант	Кратность разведения	Оптическая плотность (A)					Крахмал, мг (X)					Крахмал, мг (C - X)				
		Время после внесения фермента, мин														
		0	5	10	15	20	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20
1	5															
2	10															
3	20															
4	50															

Примечание. X — остаточная концентрация крахмала; C — исходная концентрация крахмала с учетом разведения; (C - X) — количество прогидролизованного крахмала.

Полученные результаты используют для построения кривых хода ферментативной реакции гидролиза крахмала при разных концентрациях (разведениях) фермента, определения начальной скорости и выявления зависимости $V_{нач}$ от концентрации фермента.

4. Изменение активности амилаз при прорастании зерна.

В работе используют непроросшее зерно и зерно различных сроков прорастания (одни сутки, двое и трое суток).

Солодовую вытяжку получают, как описано в п. 3. При этом необходимо учитывать увеличение активности амилаз при прорастании и перед определением активности амилаз солода провести разведение вытяжки согласно данным, полученным в п. 3. Определение активности амилаз для всех вариантов проводят согласно принятой методике (см. п. 3).

Полученные данные вносят в табл. 7.4, учитывая кратность разведения амилаз.

Таблица 7.4

Результаты определения активности амилаз при прорастании зерна

Материал	Кратность разведения	Время гидролиза, мин	Активность амилаз		
			Оптическая плотность (A)	Крахмал, мг (X)	Крахмал, мг ($C - X$)
Непроросшее зерно		0			
		5			
		10			
		15			
		20			
1 сутки прорастания		0			
		5			
		10			
		15			
		20			
2 суток прорастания		0			
		5			
		10			
		15			
		20			
3 суток прорастания		0			
		5			
		10			
		15			
		20			

Примечание. X — остаточная концентрация крахмала; C — исходная концентрация крахмала с учетом разведения; $(C - X)$ — количество прогидролизованного крахмала.

По полученным данным строят графики:

♦ Изменения активности амилаз при разных сроках прорастания зерна в координатах: количество прогидролизованного крахмала — время гидролиза.

♦ Зависимости активности солодовых амилаз ($V_{нач}$) от времени прорастания зерна (сутки).

5. Изучение взаимодействия амилаз с ингибиторами различной природы

В качестве ингибиторов амилаз используют 0,5 %-ный раствор $CuSO_4$ и картофельный сок, в котором содержатся мощные ингибиторы амилаз белковой природы. В качестве источника фермента используют солодовую вытяжку с наибольшей активностью (см. данные п. 4). Инкубационную смесь готовят согласно табл. 7.5, причем субстрат вносят в последнюю очередь после десятиминутной выдержки фермента с ингибитором. Далее активность амилаз определяют по принятой методике (п. 3). Полученные данные вносят в табл. 7.5. По калибровочной кривой определяют степень гидролиза крахмала.

Таблица 7.5

Результаты анализа взаимодействия амилаз с ингибиторами различной природы

№ п/п	Состав инкубационной смеси				Время гидролиза, мин	Активность амилаз		
	Фермент, см ³	$CuSO_4$, см ³	H_2O , см ³	Крахмал, см ³		Оптическая плотность (A)	Крахмал, мг (X)	Крахмал, мг (C-X)
1	1	0	4	5	0			
					5			
					10			
					15			
					20			
2	1	1	3	5	0			
					5			
					10			
					15			
					20			
3	1	0,5	3,5	5	0			
					5			
					10			
					15			
					20			

Таблица 7.5 (продолжение)

Результаты анализа взаимодействия амилаз с ингибиторами различной природы

№ п/п	Состав инкубационной смеси				Время гидролиза, мин	Активность амилаз		
	Фермент, см ³	CuSO ₄ , см ³	H ₂ O, см ³	Крахмал, см ³		Оптическая плотность (A)	Крахмал, мг (X)	Крахмал, мг (C - X)
4	1	0,2	3,8	5	0			
					5			
					10			
					15			
					20			
5	1	0,1	3,9	5	0			
					5			
					10			
					15			
					20			
6	0	0	5	5	0			
					5			
					10			
					15			
					20			

Примечание. X — остаточная концентрация крахмала; C — исходная концентрация крахмала с учетом разведения; (C - X) — количество прогидролизованного крахмала

Аналогично проводится эксперимент с использованием свежего картофельного сока в качестве ингибитора амилаз солода, который получают измельчением клубней картофеля на терке с последующим отжатием через марлю. По полученным результатам строят график влияния ингибиторов на активность амилаз солода в координатах: «количество гидролизованного крахмала, мг — время гидролиза, мин», и делают выводы об ингибирующей способности CuSO₄ и картофельного сока по отношению к амилазам солода.

Лабораторная работа 7.3.2*

Протеазы и их белковые ингибиторы

Протеолитические ферменты различного происхождения (животного, растительного, микробного) подвержены влиянию белковых ингибиторов, выделенных из семян бобовых (соя, фасоль, горох и др.) и злаковых культур (пшеница, ячмень, рожь и др.). Изучение взаимодействия различных протеаз и их ингибиторов

позволяет лучше понять их поведение при технологической переработке сырья и влиянии последних на активность пищеварительных протеиназ.

Цель работы: изучить активность протеаз животного, растительно-го и микробного происхождения и выявить влияние на их активность различных ингибиторов белковой природы.

Реактивы и материалы:

- ♦ 0,5 %-ный альбумин на фосфатно-цитратном буфере рН 2,0; 6,8; и 8,0.
- ♦ 5 %-ный раствор ТХУ.
- ♦ 0,5 М Na_2CO_3 .
- ♦ Реактив Фолина (разбавленный).
- ♦ Фосфатно-цитратный буфер рН 2,0 и 6,8 и 2,0.
- ♦ Протеазы: трипсин (кристал.) — 10 мг/см³, пепсин (кристал.) — 10 мг/см³, папаин (кристал.) — 10 мг/см³, микробные протеазы (протосубтилин или др.) — 30 мг/см³.

Работа проводится в несколько этапов.

1. Определение протеолитической активности

Методика проведения анализа. В большую пробирку вносят 5 см³ 0,5 %-ного раствора альбумина, 4 см³ соответствующего буфера и термостатируют в ультратермостате при температуре 40 °С в течение 15 минут; затем добавляют 1 см³ фермента, также предварительно прогретого при заданной температуре. Содержимое пробирки быстро перемешивают и отбирают пробы через 0, 10, 20, 30 и 40 минут после внесения фермента в количестве 2 см³ в пробирки с 2 см³ ТХУ, приготовленные заранее.

Отобранные пробы оставляют на 20 минут для лучшего осаждения непрогидролизованного белка, после чего содержимое пробирок фильтруют и в фильтрате определяют содержание тирозина.

Для этого к 0,4 см³ фильтрата добавляют при непрерывном перемешивании 1 см³ 0,5 М Na_2CO_3 и 0,2 см³ разбавленного реактива Фолина.

Через 20 минут интенсивность образовавшейся окраски измеряют на ФЭКе при красном светофильтре ($\lambda = 630$ нм) в кюветах с длиной грани 5 мм.

Протеолитическую активность выражают как:

$$\Delta A = A - A^0.$$

Полученные данные сводят в табл. 7.6.

Таблица 7.6

Оптическая плотность A_{630}

Протеаза	Время после внесения фермента, мин								
	0	10		20		30		40	
	A	A	ΔA						
Трипсин									
Пепсин									
Протосубтилин									

По полученным данным определяют начальную скорость ферментативной реакции (V_0) для каждого исследуемого фермента. Для этого строят кривые хода ферментативной реакции гидролиза альбумина протеиназами различного происхождения во времени в координатах: «оптическая плотность — время действия фермента, мин».

Время, за которое реакция идет по нулевому порядку (прямолинейная зависимость), используют для проведения ферментативной реакции во 2-й части работы при исследовании ингибирующей активности белковых ингибиторов.

2. Исследование влияния белковых ингибиторов из бобовых и злаковых культур на активность протеиназ различного происхождения

А. Активность ингибиторов определяют по остаточной активности протеаз

Для этой цели используют кристаллический трипсин и какой-либо препарат микробного происхождения с наибольшей протеолитической активностью (по результатам предыдущего эксперимента).

Б. В работе используют следующие ингибиторы:

♦ Ингибитор Кунитца из соевых бобов, кристаллический препарат — 1 мг/мл.

♦ Белковые ингибиторы из семян сои, фасоли, ячменя и пшеницы.

Выделение ингибиторов из семян злаковых и бобовых культур проводят по следующей схеме:

1. Зерно измельчают на лабораторной мельничке в течение 1 минуты.

2. Экстракцию проводят дистиллированной водой в соотношении 1:10 (5 г размолотого зерна, 50 см³ Н₂О) в течение 3 минут при интенсивном перемешивании.

3. Центрифугирование ведут в течение 10 минут при 4...6 тыс. об/мин, осадок отбрасывают.

4. Надосадочную жидкость используют в качестве белковых ингибиторов.

В. Определение ингибирующей активности

Методика проведения анализа. В пробирку вносят 1 см³ фермента, 4 см³ соответствующего ингибитора и термостатируют при 40 °С в течение 15 минут, затем вносят 5 см³ субстрата (0,5 %-ный альбумин), предварительно прогретого при той же температуре.

Отбор проб в количестве 2 см³ проводят через 0 минут и 10 (20) минут после внесения субстрата. Отобранные пробы сразу же переносят в пробирки с 2 см³ 5 %-ного раствора ТХУ. После 20-минутного формирования осадка содержимое пробирок фильтруют и в фильтрате определяют содержание тирозина колориметрическим методом с реактивом Фолина.

Остаточную активность выражают как:

$$\Delta A = A - A^0$$

Ингибирующую активность рассчитывают как % от исходной. Данные вносят в табл. 7.7.

Таблица 7.7

Результаты определения ингибирующей активности

Ингибитор	Протеаза	Исходная активность ¹⁾		Остаточная активность		Ингибирующая активность, %
		ΔA_{630}	%	ΔA_{630}	%	
Кунитца	Трипсин					
	Протосубтилин					
Из сои	Трипсин					
	Протосубтилин					
Из фасоли	Трипсин					
	Протосубтилин					
Из пшеницы	Трипсин					
	Протосубтилин					
Из ячменя	Трипсин					
	Протосубтилин					

¹⁾ Исходная активность протеаз по данным эксперимента (часть 1).

Полученные данные сравнивают и делают выводы о том, какой из белковых ингибиторов проявляет большее сродство к трипсину и прото-субтилину (это можно проиллюстрировать построением диаграмм).

Лабораторная работа 7.3.3

Влияние активаторов и ингибиторов на активность солодовой α -амилазы

Активаторами называют соединения, способствующие переходу фермента в каталитически активное состояние, но не принимающие участие в ферментативной реакции. Широко известно активирующее действие сульфгидрильных соединений (цистеина, глутатиона) на тиоловые ферменты, а также активация ферментов некоторыми ионами металлов.

Ингибиторы — вещества, специфически снижающие активность ферментов или полностью подавляющие их активность. Изучение влияния ингибиторов имеет важное значение для раскрытия механизмов каталитического действия ферментов.

Для α -амилазы активатором являются ионы кальция, которые стабилизируют третичную структуру ферментного белка. При удалении ионов кальция из раствора диализом или добавлением ЭДТА (этилен-диаминтетраацетат) активность α -амилазы резко падает. Таким образом, ЭДТА — сильный комплексообразующий агент, является ингибитором α -амилазы. Присутствие активаторов и ингибиторов в большей степени сказывается на стабильности фермента при разных значениях pH и температуры.

Цель работы: изучение влияния ионов кальция и ЭДТА на активность солодовой α -амилазы при разных значениях pH и на ее термостабильность.

Реактивы и материалы:

- Солодовая вытяжка, свежеприготовленная.
- Фосфатный буфер с pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0.
- ЭДТА — 0,02 М раствор.
- CaCl_2 — 0,05 %-ный раствор.
- Раствор крахмала — 1 %.
- Раствор йода на 0,1 н. HCl.

1. Влияние ионов кальция и ЭДТА на активность α -амилазы солода при разных значениях pH

Вся работа делится на несколько вариантов, которые отличаются значениями pH, при которых проводят эксперимент.

Методика проведения анализа. Пробирки заполняют согласно табл. 7.8 и прогревают при температуре 40°C, причем фермент прогревают отдельно и вносят после предварительного выравнивания температуры.

Таблица 7.8

Данные для проведения анализов и их результаты

№	Крах- мал, см ³	CaCl ₂ , см ³	ЭДТА, см ³	Вода, см ³	Буфер, см ³	Фер- мент, см ³	Время ре- акции, мин	Удельная ак- тивность фер- мента УА
1	5	—	—	3	1	1		
2	5	1	—	2	1	1		
3	5	—	1	2	1	1		
4	5	1	1	1	1	1		

Активность α-амилазы определяют капельным методом. Для этого через каждые 60 секунд после внесения фермента из пробирки отбирают пробу стеклянной палочкой в виде капли на белую фарфоровую пластину, соединяют ее с каплей рабочего раствора йода. Отмечают время, за которое происходит расщепление крахмала до продуктов, не окрашиваемых йодом. Оно должно находиться в пределах от 10 до 20 минут, если необходимо изменяют разведение солодовой вытяжки.

В разбавленной солодовой вытяжке определяют содержание белка по методу Лоури.

Удельную амилолитическую активность рассчитывают по формуле:

$$УА = \frac{A \cdot 60}{P \cdot T},$$

где a — количество крахмала в пробе, мг; 60 — пересчет на единицу времени (1 час); T — время в мин, за которое произошло расщепление крахмала до неокрашиваемых йодом продуктов; P — количество белка в ферментном растворе, мг/см³.

2. Влияние ионов кальция и ЭДТА на стабильность α-амилазы солода при нагревании

Методика проведения анализа. Четыре пробирки (для каждого значения рН) заполняют, как указано в табл. 7.8, не внося крахмал (субстрат).

Пробирки выдерживают на водяной бане при 55°C в течение 20 минут, затем охлаждают до 30°C и после этого в каждую пробирку вно-

сят крахмал, предварительно прогретый при 30 °С. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и замечают время начала реакции.

Активность α -амилазы определяют капельным методом. Прогревание при 55 °С значительно снижает активность фермента, поэтому для опыта желательно использовать солодовую вытяжку с активностью примерно в 5 раз более высокой, чем для первого опыта. В том случае, если активность амилаза проявляется очень слабо, то в графу таблицы «Время реакции» записывают окраску с йодом через 40 минут гидролиза крахмала (синяя, фиолетовая, красно-бурая).

Экспериментальные данные 1 и 2 опытов сводят в таблицу (табл. 7.9).

Таблица 7.9

Сводная таблица

рН	УА до прогревания фермента				УА после прогревания фермента			
	Фермент	Фермент + + CaCl ₂	Фермент + + ЭДТА	Фермент + + CaCl ₂ + + ЭДТА	Фермент	Фермент + + CaCl ₂	Фермент + + ЭДТА	Фермент + + CaCl ₂ + + ЭДТА
4,0								
4,5								
5,0								
5,5								
6,0								

На основании полученных данных делают выводы:

1. О влиянии рН на стабильность фермента.
2. О влиянии ионов кальция и ЭДТА на активность фермента.
3. О влиянии ионов кальция и ЭДТА на стабильность фермента при прогревании.

Лабораторная работа 7.3.4

Фракционирование картофельного сока методом гель-хроматографии. Изучение ингибирующей активности различных фракций

Многочисленные данные показывают присутствие в картофельном соке ингибиторов протеаз белкового происхождения. В клеточном соке картофеля обнаружены ингибиторы трипсина — пищевари-

тельной протеиназы серинового типа и нейтральных протеаз пшеницы — ферментов, играющих важную роль в тестоведении.

Изучение действия клеточного сока картофеля, прогретого при температуре 70 °С в течение 15 минут (при данном режиме осаждается 85 % белка), показало, что прогретый сок значительно сильнее ингибирует как трипсин, так и нейтральные протеазы пшеницы. Это можно объяснить наличием в нем фенольных соединений, которые в результате прогревания высвобождаются из комплекса с белками, так как последние коагулируют при данном режиме обработки. В результате действие картофельного сока на протеазы многократно усиливается.

Цель работы: провести исследование ингибирующей активности различных фракций свежего и прогретого картофельного сока, полученных после фракционирования на колонке с сефадексом G-50 на трипсин и препараты микробного происхождения.

Реактивы и материалы:

- ♦ Картофельный сок — источник ингибиторов протеаз.
- ♦ 0,5 %-ный раствор альбумина.
- ♦ 5 %-ный раствор ТХУ.
- ♦ 0,5 М Na₂CO₃.
- ♦ Фосфатно-цитратный буфер с рН 8,0.
- ♦ Реактив Фолина (разбавленный).
- ♦ Реактивы для определения белка по Лоури.
- ♦ Реактивы для калибровки колонки.
- ♦ Трипсин, кристал. — 5 мг/см³.
- ♦ Препарат микробной протеазы, например протосубтилин Г10Х — 30 мг/см³.

Для выполнения работы группа студентов делится на две подгруппы, одна из которых фракционирует свежий картофельный сок, другая — прогретый.

1. Получение картофельного сока

А. Свежий картофельный сок получают с помощью соковыжималки и дальнейшего центрифугирования при 4...6 тыс. об/мин в течение 10 минут (или тщательно вымытый картофель натирают на терке и отжимают через двойной слой марли, затем центрифугируют).

Б. Прогретый картофельный сок получают нагреванием свежего сока в течение 15 минут при 70 °С и дальнейшим центрифугированием при 4...6 тыс. об/мин в течение 10 мин.

Надосадочную жидкость используют в качестве ингибиторов. По литературным данным, при таком режиме осаждаются от 80 до 85 % белков.

2. Фракционирование картофельного сока на колонке с сефадексом G-50

А. Калибровка колонки

Колонку, заполненную набухшим сефадексом G-50, необходимо откалибровать, то есть установить $V_{св}$ и $V_{общ}$. Для этой цели используют смесь высокомолекулярного вещества, выходящего со свободным объемом колонки — декстрана синего, с молекулярной массой около 2 млн Да, и низкомолекулярного вещества, выходящего с объемом элюции, равным общему объему колонки бихромата калия (см. лаб. раб. 1.4.3, с. 39).

• Внутренний объем колонки равен:

$$V_{вн} = V_{общ} - V_{св}$$

Коэффициент распределения вещества:

$$k = \frac{V_{эл} - V_{св}}{V_{общ} - V_{св}}$$

Элюцию проводят дистиллированной водой, объем собираемых фракций — 5 см³.

Б. Фракционирование картофельного сока

На откалиброванную колонку наносят 5 см³ картофельного сока:

- ♦ 1-ая колонка — свежий картофельный сок;
- ♦ 2-ая колонка — прогретый картофельный сок.

Элюцию проводят H₂O, объем собираемых фракций — 5 см³.

В собранных фракциях определяют содержание белка и ингибирующую активность.

3. Определение белка по методу Лоури

Определение содержания белка проводят в каждой фракции (п. 1.2.3, с. 23). Содержание белка выражают в единицах шкалы прибора или в мг/см³, используя для расчета калибровочную кривую.

Полученные данные для свежего картофельного сока и для прогретого картофельного сока вносят в две таблицы по образцу табл. 7.10.

Таблица 7.10
Фракционирование свежего (прогретого)
картофельного сока

№ фракции	Объем элюата, см ³	Содержание белка	
		A_{630}	мг/см ³
1			
2			
3			
4			
и т. д. до $V_{\text{общ}}$			

По полученным данным строят графики элюции белка в координатах: оптическая плотность (белок, в мг/см³) — объем элюции, в см³, и выявляют фракции с наибольшим содержанием белка, которые объединяют (I и II пики) и используют для исследования ингибирующей активности по отношению к трипсину и протосубтилину Г10Х.

4. Исследование объединенных фракций на ингибирующую активность

Для выполнения этой части работы каждая группа студентов готовит 4 инкубационные смеси, состоящие из 1 см³ фермента (трипсина/протосубтилин) + 4 см³ ингибитора (I и II пики) + 5 см³ 0,5 %-ного раствора альбумина (субстрат). Причем смесь фермента и ингибитора прогревают отдельно от субстрата в течение 15 минут при 40 °С в ультратермостате.

По истечении времени прединкубации субстрат вносят в инкубационную смесь и отбирают пробы по 2 см³ через 0 и 10 (20) минут после внесения субстрата. Отобранные пробы переносят в пробирки с 2 см³ 5 %-ного раствора ТХУ и оставляют на 20 минут для осаждения непрогидролизованного белка, после чего содержимое пробирок фильтруют и в фильтрате определяют содержание тирозина.

Методика проведения анализа. К 0,4 см³ фильтрата при непрерывном перемешивании добавляют 2 см³ 0,5 М Na₂CO₃ и 0,2 см³ разбавленного реактива Фолина. Через 20 минут интенсивность образовавшейся окраски определяют на ФЭКе при красном светофильтре (630 нм).

Остаточную активность протеаз выражают как:

$$\Delta A = A - A^0.$$

Ингибирующую активность выражают как процент от исходной активности. Полученные данные вносят в таблицы (см. табл. 7.11).

Таблица 7.11
Действие белковых ингибиторов свежего (прогретого) картофельного сока на протеазы

Ингибитор	Белок по Лоури		Остаточная активность, %	
	A_{620}	мг/см ³	Трипсин	Протосубтилин
I				
II				

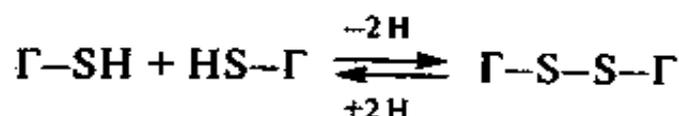
По полученным данным делают выводы об ингибирующей особенности различных фракций на трипсин и протеазы микробного происхождения.

Лабораторная работа 7.3.5

Определение интенсивности выделения дрожжами глутатиона в процессе брожения

Глутатион, широко распространенный в природе биологически активный трипептид, построен из остатков трех аминокислот: глутаминовой кислоты, цистеина и глицина.

Функциональной группой глутатиона является сульфгидрильная группа (SH-группа), поэтому для восстановленного глутатиона принято сокращение Г-SH. Восстановленный глутатион может окисляться в дисульфидную форму мягкими окислителями, например йодом или бромом.



Глутатион может окисляться также молекулярным кислородом в присутствии катализаторов, а также дегидроаскарбиновой кислотой в присутствии соответствующего фермента. Окисленная форма глутатиона может превращаться в восстановленную под действием силь-

ных восстановителей или ферментов. Благодаря ферментативному окислению и восстановлению глутатион служит биологическим переносчиком водорода.

Целый ряд протеролитических ферментов растительного происхождения активируется сульфгидрильными соединениями, в том числе цистеином и глутатионом.

В больших количествах глутатион содержится в зародышах злаковых культур, а также в дрожжах. Его содержание в дрожжах доходит до 1 % на сухой вес (влажность прессованных дрожжей составляет около 75 %).

Дрожжи являются основным источником глутатиона в тесте. Однако воздействие на белки и ферменты муки в процессе тестоведения будет оказывать не весь глутатион, содержащийся в дрожжах, а только его часть, которая при брожении выделится из дрожжевых клеток в окружающую среду. Живые неповрежденные дрожжевые клетки в воде практически не выделяют глутатиона. Активно бродящие дрожжевые клетки (при суспендировании в растворе сахара) выделяют в окружающую среду значительные количества глутатиона.

Цель работы: изучить влияние различных факторов (этилового спирта, сульфата аммония) на интенсивность выделения глутатиона бродящими дрожжевыми клетками.

Реактивы и материалы:

- ♦ Прессованные дрожжи, свежие.
- ♦ 10 %-ный раствор сахарозы.
- ♦ 1 %-ный раствор сульфата аммония.
- ♦ Этиловый спирт.
- ♦ 1,5 %-ный раствор йодида калия.
- ♦ 0,001 н. раствор йодата калий.
- ♦ 1 %-ный раствор крахмала, насыщенный хлористым натрием (индикатор).
- ♦ 5 %-ная метафосфорная кислота.

Для проведения работы студенты разбиваются на группы, каждая из которых выполняет один из вариантов опыта, представленных в табл. 7.12.

Во 2-м варианте к суспензии дрожжей добавляется сахароза — хорошо сбраживаемый сахар, источник углеродного питания; в 3-м варианте — сахароза и сульфат аммония — источник азотного питания; в 4-м варианте — сахароза и этиловый спирт в такой концентрации, которая вызывает нарушение нормальных физиологических процессов в дрожжевой клетке.

Таблица 7.12

Варианты постановки опытов

Номер варианта	Состав инкубационной смеси				
	Дрожжи прессованные, г	Вода, см ³	10 % раствор сахарозы, см ³	1 % раствор (NH ₄) ₂ SO ₄ , см ³	Этиловый спирт, см ³
1	15	150	—	—	—
2	15	75	75	—	—
3	15	60	75	15	—
4	15	50	75	—	15

Методика проведения анализа. Навеску дрожжей 15 г вносят в стакан на 400...500 см³ и добавляют заданное количество воды, подогретой до 30 °С, согласно варианту (табл. 7.12).

Стеклянной палочкой осторожно разминают комочки дрожжей и стакан ставят в водяной термостат с температурой 30 °С, оборудованной переносной мешалкой.

Включают мешалку и вносят в стакан остальные компоненты инкубационной смеси, предварительно термостатированные при 30 °С. Через одну минуту, не останавливая мешалки, отбирают из стакана пробу дрожжевой суспензии объемом 20 см³. Во время отбора пробы интенсивность перемешивания должна быть достаточной для того, чтобы поддерживать однородность суспензии во всем объеме жидкости.

После отбора пробы мешалку выключают, а дрожжевую суспензию оставляют в термостате. Следующие отборы производят через 1, 2, 3 часа. Каждый раз за 1 минуту до отбора пробы включают мешалку и отбор производят при интенсивном перемешивании.

Отобранные пробы центрифугируют и в надосадочной жидкости определяют глутатион методом амперометрического титрования или иодометрическим методом. Ниже приводится ход определения глутатиона иодометрическим методом.

Проведение анализа. К 10 см³ пробы (в данном случае центрифугата) добавляют 2 см³ 5 %-ной метафосфорной кислоты, 2 см³ 1,5 %-ного раствора йодистого калия и несколько капель раствора крахмала. Титруют 0,001 н. КIO₃ из микробюретки до появления синего окрашивания. При расчетах 1 см³ 0,001 н. КIO₃ считают эквивалентным 0,307 мг восстановленного глутатиона.

Метод иодометрического титрования не является специфичным, так как иодоватокислый калий окисляет не только глутатион,

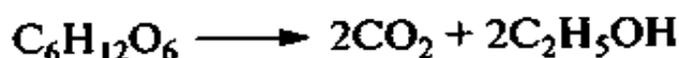
но и сульфгидрильные группы других соединений, в том числе сульфгидрильные группы белков. В данном случае подавляющее количество оттитрованных сульфгидрильных групп будет принадлежать глутатиону.

Полученные для всех вариантов данные сводят в таблицу и используют для построения графиков интенсивности выделения дрожжами глутатиона при разных условиях инкубирования.

Лабораторная работа 7.3.6

Исследование продуктов, выделяемых дрожжами при спиртовом брожении

Многие пищевые технологии основаны на использовании спиртового брожения. Суммарное уравнение спиртового брожения имеет следующий вид:



Однако это уравнение не отражает всего многообразия продуктов, образующихся в бродящей системе и оказывающих сильное воздействие на сырье в ходе технологического процесса.

Цель работы: получить представления о многообразии продуктов, образующихся в бродящей системе, при исследовании дрожжевой воды на разных этапах брожения.

Дрожжевой водой называют инкубационную смесь, полностью освобожденную от дрожжевых клеток и содержащую лишь продукты жизнедеятельности дрожжей и компоненты питательной среды. Работа может быть представлена в разных вариантах. Ниже приводится один из них.

Реактивы и материалы:

- ♦ Свежие пекарские дрожжи.
- ♦ Сахароза кристаллическая.
- ♦ Реактивы для определения белка по Лоури.
- ♦ Реактивы для определения глутатиона.
- ♦ 0,1 н. NaOH.
- ♦ pH-метр или универсальная лакмусовая бумага.

Методика проведения анализа. Исследования проводят в двух вариантах:

а) «голодающие» дрожжи — контроль; б) «бродящие» дрожжи — опыт.

В контрольном варианте: 15 г свежих прессованных дрожжей суспендируют в колбе в 200 см³ воды при 30 °С.

В опытном варианте: 15 г свежих прессованных дрожжей суспендируют в колбе в 200 см³ воды, при той же температуре с добавлением 15 г сахарозы.

Обе колбы помещают в водяной термостат при 30 °С.

Из контрольной колбы отбирают в цилиндр 40 см³ дрожжевой суспензии. Перед отбором пробы круговыми движениями перемешивают содержимое колбы, добиваясь однородности суспензии во всем объеме.

Отобранную пробу центрифугируют и исследуют надосадочную жидкость по следующим показателям:

- ♦ содержание водорастворимого белка по методу Лоури (см. п. 1.2.3, с. 23);

- ♦ содержание восстановленного глутатиона (используют 10 см³ центрифугата) (см. лаб. раб. 7.3.5, с. 189);

- ♦ кислотность (титрование 10 см³ центрифугата 0,1 н. NaOH);

- ♦ рН (с помощью рН-метра или универсальной лакмусовой бумаги).

В дальнейшем из каждой колбы отбирают по 40 см³ однородной суспензии через 1, 2, 3 часа после начала термостатирования. Пробы центрифугируют и в центрифугатах определяют перечисленные выше показатели.

Работа организуется таким образом, чтобы каждая проба дрожжевой воды была проанализирована по всем показателям до отбора следующей пробы. По завершении эксперимента полученные данные сводят в табл. 7.13 и строят графики, сравнивая поведение дрожжей в условиях активного брожения и голодания.

Таблица 7.13

Результаты эксперимента

Вариант опыта	Время инкубации, ч	Белок по Лоури, мг/см ³	Глутатион, мг	Общая кислотность, см ³ 0,1 н. NaOH	рН
«Голодающие» дрожжи (контроль)	0				
	1				
	2				
	3				
«Бродящие» дрожжи (опыт)	0				
	1				
	2				
	3				

Дрожжевая вода после трех часов инкубации может быть дополнительно исследована на ее воздействие на белковый комплекс зерна.

Возможны, например, такие варианты исследования:

1. Влияние дрожжевой воды на клейковину

Для этого замешивают пшеничную муку для отмывания клейковины на простой водородной воде и дрожжевой воде (25 г муки + 14 мл воды). Реологические характеристики (упругость) клейковины оценивают на приборе ИДК. По величине условных единиц прибора клейковину относят к одной из трех групп по качеству (табл. 7.14).

Таблица 7.14

Классификация клейковины по реологическим характеристикам

Показания прибора, усл. ед.	Группа качества	Характеристика клейковины
От 0 до 15	III	Неудовлетворительная, крепкая
От 20 до 40	II	Удовлетворительная, крепкая
От 45 до 175	I	Хорошая
От 80 до 100	II	Удовлетворительная, слабая
От 105 до 200	III	Неудовлетворительная, слабая

2. Влияние дрожжевой воды на растворимость белков муки

Для этого 1 г пшеничной муки суспендируют в 50 см³ воды и в дрожжевой воде при интенсивном перемешивании на мешалке в течение 3 минут. Затем суспензию центрифугируют и определяют в центрифугате белок по Лоури.

Полученные данные обобщают, анализируют и делают вывод о влиянии дрожжевой воды на качество клейковины и растворимость белков пшеничной муки.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные этапы выделения и очистки ферментов.
2. Какие принципиально важные условия необходимо соблюдать при работе с ферментами?
3. Назовите способы выражения активности ферментов. Какие из них преимущественно применяются на практике?
4. На чем основано определение протеолитической активности по методу Ансона?

5. Что лежит в основе метода колориметрического определения амилазной активности?
6. Какую реакцию катализирует фермент липоксигеназа, на чем основанное определение его активности?
7. В чем состоит сущность метода определения активности каталазы и пероксидазы? Какие реакции катализируют эти ферменты?
8. В чем состоит особенность определения липазы зерновых культур титриметрическим методом?
9. Какие выводы можно сделать на основании изучения действия активаторов и ингибиторов различного происхождения на фермент? Ответ подтвердите примерами.
10. Каковы функции глутатиона в клетке, на чем основано его определение?

ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

К пищевым добавкам относятся вещества различного химического строения природного или искусственного происхождения, в нормальных условиях не употребляемые как пища или типичные ингредиенты пищи, но преднамеренно добавляемые в пищевой продукт по техническим соображениям с целью улучшения или обеспечения производственного процесса или отдельных операций, увеличения стойкости продукта к различным видам порчи, сохранения структуры и внешнего вида продукта или намеренного изменения органолептических свойств.

В соответствии с этим определением все методы анализа разрешенных пищевых добавок (добавок с установленными критериями безопасности) могут быть подразделены на 3 группы:

- ♦ методы определения критериев качества пищевой добавки (содержание основного вещества, регламентируемых примесей, показателей химической и микробиологической безопасности);
- ♦ методы определения технологической эффективности добавки в пищевом объекте в соответствии с целью введения (эмульгирующая способность, эффективность стабилизации окраски, эффект антиоксидантного действия, гелеобразование, консервирующее действие и т. п.);
- ♦ методы качественного и количественного определения конкретной добавки в составе пищевого продукта.

В зависимости от цели исследования для решения конкретной практической задачи могут использоваться различные методы.

При решении практических задач, связанных с определением эффективности пищевых добавок, широко применяются методы реологических исследований, описанные в специальных руководствах.

8.1. ПИЩЕВЫЕ ЭМУЛЬГАТОРЫ

Эмульгаторы — пищевые добавки, обеспечивающие образование и сохранение однородной дисперсии двух или более несмешивающихся

веществ (эмульсий, суспензий, пен и др.), благодаря способности адсорбироваться на поверхности раздела фаз с образованием моно- или полимолекулярного слоя ориентированных молекул и снижать поверхностное натяжение, обусловленное нескомпенсированным полем межмолекулярных сил на межфазной поверхности.

Типичный эмульгатор является поверхностно-активным веществом (ПАВ), молекула которого имеет дифильное строение, определяемое наличием гидрофильной (липофобной) и гидрофобной (липофильной) частей. Гидрофильная часть молекулы ПАВ обладает электрическим дипольным моментом и содержит одну или несколько полярных групп — гидроксильную, карбоксильную и другие, имеющие в своем составе азот, фосфор, серу, полиоксиэтиленовую цепь и др. Липофильная часть молекулы представляет собой обычно углеводородный радикал, лишенный заметного дипольного момента, что обуславливает сродство молекулы к неполярным или малополярным средам. Эффективность эмульгатора тем выше, чем больше полярные и неполярные части его молекул соответствуют природе обеих фаз эмульсии.

Наибольшее распространение в технологиях пищевых продуктов получили несколько видов пищевых эмульгаторов, которыми являются:

- ♦ моно- и диглицериды жирных кислот (Е 471) — эфиры глицерина и высших жирных кислот, получаемые глицеролизом пищевых жиров;
- ♦ эфиры моно-, диглицеридов и пищевых кислот — уксусной, молочной, лимонной, винной, диацетилвинной (Е 471a...Е 471d);
- ♦ фосфатиды — сопутствующие жирам и маслам вещества, выделяемые из них гидратацией, получившие коммерческое наименование «Лецитины» (Е 322);
- ♦ синтетические аналоги фосфатидов — аммониевые фосфатиды (Е 442), получаемые химическим путем;
- ♦ эфиры сахарозы и жирных кислот (Е 473);
- ♦ эфиры молочной и стеариновой (олеиновой) кислот — лактилаты (Е 481).

Эмульгирующая способность эмульгатора зависит от особенностей химического строения его молекул и характеризуется гидрофильно-липофильным балансом — ГЛБ (соотношением размеров полярной и неполярной частей молекулы). Примерное значение ГЛБ эмульгатора можно рассчитать по формуле:

$$\text{ГЛБ} = \frac{M_1}{M_2} \cdot 20,$$

где M_1 — молекулярная масса гидрофильной части молекулы; M_2 — общая молекулярная масса молекулы.

Другой расчетный метод ГЛБ учитывает особенности различных функциональных и ассоциированных групп в формировании гидрофильно-липофильного баланса (табл. 8.1), который определяют по формуле:

$$\text{ГЛБ} = \Sigma(\text{числа гидрофильных групп}) - \Sigma(\text{числа липофильных групп}) + 7$$

Таблица 8.1

Числа функциональных групп в гидрофильно-липофильном балансе

Группа	Групповое число	Группа	Групповое число
<i>Гидрофильные группы</i>			
$-\text{SO}_4\text{Na}$	38,7	Эфир (другой)	2,4
$-\text{COOK}$	21,1	$-\text{COOH}$	1,9
$-\text{COONa}$	19,1	$-\text{OH}$ (кольцо сорбитана)	0,5
Сульфонат	-11	$-\text{OH}$ (другой)	1,9
$-\text{N}(\text{CH}_3)_3$	9,4	$-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})-$	0,33
Эфир (кольцо сорбитана)	6,8		
<i>Липофильные группы</i>			
$-\overset{ }{\text{C}}\text{H}-$...	$-\text{CH}_3$...
$-\text{CH}_2-$	0,475	$=\text{CH}-$...

8.2. ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ПИЩЕВЫХ ЭМУЛЬГАТОРОВ ГЛИЦЕРИДНОЙ ПРИРОДЫ

Состав эмульгатора определяет особенности его поверхностно-активных свойств, от которых зависит эффективность поведения в дисперсной системе.

Коммерческие образцы эмульгаторов глицеридной природы могут отличаться содержанием моно- и диглицеридов, включать свободные жирные кислоты и другие соединения липидной природы, например, фосфолипиды (в случае композиционных эмульгаторов, применяемых в технологии маргаринов). В зависимости от назначения эмульгаторы этой группы могут иметь различный жирнокислотный состав.

В основе определения качественного и количественного группового (фракционного) состава эмульгаторов — моно-, диглицеридов лежит метод тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол», включающий денситометрический анализ полученных хроматограмм.

При определении жирнокислотного состава эмульгаторов глицеридной природы используют метод газожидкостной хроматографии, применяемый при изучении состава липидов (см. п. 3.2, с. 95). Разделению на хроматографической колонке газового хроматографа подвергают метиловые или этиловые эфиры жирных кислот, входящих в состав эмульгатора, которые получают переэтерификацией глицеридов и метилированием (этилированием) жирных кислот.

Реактивы и материалы:

- ♦ Хлороформ.
- ♦ Фосфорно-молибденовая кислота, 5 %-ный раствор в этаноле.
- ♦ Система растворителей: свежеприготовленная смесь гексана, диэтилового эфира и уксусной кислоты, взятых в объемном соотношении 80 : 20 : 1.

Методика проведения анализа. Для определения группового состава эмульгатора навеску средней гомогенизированной пробы образца взвешивают на аналитических весах в количестве 0,1 г, переносят в пробирку и растворяют в 5 мл хлороформа до получения 2 %-ного раствора.

Пластинки «Силуфол» предварительно окрашивают фосфорно-молибденовой кислотой, опуская их в 5 %-ный раствор кислоты в этаноле, и затем высушивают на воздухе.

На подготовленную пластину «Силуфол» с размеченной на расстоянии 10 мм от нижнего и боковых краев пластины линией старта с помощью микрошприца наносят в виде сплошной узкой полосы длиной до 7 мм 1 мкл (10^{-6} см³) 2 %-ного раствора эмульгатора в хлороформе.

Разделение проводят в стеклянной камере с пришлифованной крышкой. Камеру заполняют системой растворителей до высоты не более 5 мм для того, чтобы растворитель не касался стартовой линии пластины. Пластину с нанесенным образцом эмульгатора помещают в камеру, вертикально погружая в разделительную смесь, и оставляют в ней до тех пор, пока высота подъема фронта растворителя не достигнет отмеченной длины разделительного пути. Разделительный путь (расстояние от линии старта до линии фронта растворителя) составляет для пластины «Силуфол» приблизительно 90 мм. После окончания хроматографического разделения пластину вынимают из камеры и су-

шат в горизонтальном положении до полного испарения остатков растворителей.

Проявление пластины проводят в термостате в течение 5...10 минут при температуре 60 °С. Идентификацию фракций выполняют с помощью стандартных веществ — метчиков или по значению R_f для данной системы растворителей.

Количественную оценку группового состава образца эмульгатора осуществляют на специальном приборе — денситометре, позволяющем получить результат измерений в виде графической записи (денситограммы).

При расчете концентраций компонентов, входящих в состав исследуемого образца, используют метод внутренней нормализации.

Концентрация каждого компонента в относительных процентах вычисляется по формуле:

$$C_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \cdot 100 \%, \quad (8.1)$$

где S_i — геометрическая площадь соответствующего пика на денситограмме.

При определении жирнокислотного состава эмульгатора первоначально осуществляют подготовку образца к газохроматографическому анализу путем перевода в эфиры жирных кислот.

Для получения эфиров жирных кислот в круглодонной колбе вместимостью 100 см³ взвешивают на аналитических весах 50 мг средней гомогенизированной пробы образца эмульгатора, растворяют в 10 см³ хлороформа, добавляют в колбу 10 см³ спирта и 0,1 см³ ацетилхлорида (работа выполняется под тягой!). Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают реакционную массу в течение 1 часа на слабом пламени горелки. По истечении этого времени горелку отключают, реакционную массу охлаждают, переносят в делительную воронку, добавляют 20 см³ хлороформа и 10 см³ дистиллированной воды. Нижний хлороформный раствор собирают в круглодонную колбу и удаляют хлороформ на приборе для простой перегонки при температуре водяной бани ~70 °С.

Полученные эфиры жирных кислот разбавляют 1 см³ гексана и 1 мкл (10⁻⁶ см³) полученного раствора вводят в газовый хроматограф. Результаты анализа фиксируются на записывающем приборе в виде хроматограммы.

Число пиков на хроматограмме соответствует числу высокомолекулярных жирных кислот в исследуемом образце эмульгатора.

Расчет хроматограммы осуществляется методом внутренней нормализации, при котором концентрацию компонента C_i анализируемой смеси рассчитывают по формуле (8.1).

8.3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 8.3.1

Определение группового и жирнокислотного состава эмульгаторов глицеридной природы

Цель работы: идентификация и количественное определение состава трех эмульгаторов глицеридной природы.

Реактивы и материалы:

♦ Объекты исследований — коммерческие образцы эмульгаторов глицеридной природы:

— образец 1 — дистиллированные моноглицериды с низким йодным числом;

— образец 2 — 60 %-ные моноглицериды с высоким йодным числом;

— образец 3 — композиционная смесь моноглицеридов и лецитина.

♦ Хлороформ.

♦ Фосфорно-молибденовая кислота, 5 %-ный раствор в этаноле.

♦ Система растворителей: свежеприготовленная смесь гексана, диэтилового эфира и уксусной кислоты, взятых в объемном соотношении 80 : 20 : 1.

Методика выполнения анализа. Навеску средней гомогенизированной пробы образца эмульгатора взвешивают на технических весах в количестве 0,1 г, переносят в пробирку и растворяют в 5 мл хлороформа для получения 2 %-ного раствора.

Пластинки «Силуфол» предварительно окрашивают фосфорно-молибденовой кислотой, опуская их в 5 %-ный раствор кислоты в этаноле, и затем высушивают на воздухе.

На подготовленную пластину «Силуфол» с линией старта, размеченной на расстоянии 10 мм от нижнего и боковых краев пластины, с помощью микрошприца наносят в виде сплошной узкой полосы длиной до 7 мм 1 мкл (10^{-6} см³) 2 %-ного раствора эмульгатора в хлороформе.

Разделение проводят в стеклянной камере с шлифованной крышкой. Камеру заполняют системой растворителей до высоты не

более 5 мм для того, чтобы растворитель не касался стартовой линии пластины. Пластину с нанесенным образцом эмульгатора помещают в камеру, вертикально погружая в разделительную смесь, и оставляют в ней до тех пор, пока высота подъема фронта растворителя не достигнет отмеченной длины разделительного пути. Разделительный путь (расстояние от линии старта до линии фронта растворителя) составляет для пластины «Силуфол» приблизительно 90 мм. После окончания хроматографического разделения пластину вынимают из камеры и сушат в горизонтальном положении до полного испарения остатков растворителей.

Проявление пластины проводят в термостате в течение 5...10 минут при температуре 60 °С. Идентификацию фракций выполняют с помощью стандартных веществ — метчиков или по значению R_f для данной системы растворителей.

Анализ трех образцов эмульгаторов проводят параллельно.

Результаты идентификации вносят в таблицу (табл. 8.2).

Таблица 8.2

Идентификация группового состава исследуемых образцов эмульгаторов

№ п/п	Компоненты в составе эмульгатора	Значение R_f			
		по литературным данным	исследуемых образцов эмульгаторов		
			Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	Фосфоглицериды	На старте			
2	Моноацилглицерины	0,02			
3	1,2-диацилглицерины, 1,3-диацилглицерины	0,13...0,21			
4	Свободные жирные кислоты	0,39			
5	Триацилглицерины	0,60			

Количественную оценку группового состава образца эмульгатора осуществляют на специальном приборе — денситометре, позволяющем получить результат измерений в виде графической записи (денситограммы).

При расчете концентраций компонентов, входящих в состав исследуемого образца, используют метод внутренней нормализации.

Концентрации компонентов, входящих в состав эмульгатора, определяют по денситограмме с использованием метода внутренней нормализации и вычисляют в относительных процентах по формуле (8.1), с. 200.

Результаты вычислений вносят в таблицу (табл. 8.3).

Таблица 8.3

Количественный групповой состав эмульгаторов

№ п/п	Компоненты в составе эмульгатора	Относительное содержание компонентов в исследуемых образцах, %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	Фосфолипиды			
2	Моноацилглицерины			
3	1,2-диацилглицерины, 1,3-диацилглицерины			
4	Свободные жирные кислоты			
5	Триацилглицерины			

Для получения эфиров жирных кислот в круглодонной колбе вместимостью 100 см³ взвешивают на аналитических весах 50 мг средней гомогенизированной пробы образца эмульгатора, растворяют в 10 см³ хлороформа, добавляют в колбу 10 см³ спирта и 0,1 см³ ацетилхлорида (работа выполняется под тягой!). Колбу присоединяют к обратному холодильнику и реакционную массу нагревают в течение 1 часа на слабом пламени горелки. По истечении этого времени горелку отключают, реакционную массу охлаждают, переносят в делительную воронку, добавляют 20 см³ хлороформа и 10 см³ дистиллированной воды. Нижний хлороформный раствор собирают в круглодонную колбу и удаляют хлороформ на приборе для простой перегонки при температуре водяной бани около 70 °С.

Полученные эфиры жирных кислот разбавляют 1 см³ гексана и 1 мкл (10⁻⁶ см³) полученного раствора вводят в газовый хроматограф. Результаты анализа фиксируются на записывающем приборе в виде хроматограммы.

Число пиков на хроматограмме соответствует числу высокомолекулярных жирных кислот в исследуемом образце эмульгатора.

Анализ жирнокислотного состава трех образцов эмульгаторов проводят параллельно.

Расчет хроматограмм осуществляют методом внутренней нормализации, при котором концентрацию компонента C_i анализируемой смеси рассчитывают по формуле (8.1), с. 200.

После расчета хроматограмм составляют таблицу для сравнения жирнокислотного состава исследуемых образцов эмульгаторов (табл. 8.4).

Таблица 8.4

Жирнокислотный состав исследуемых образцов эмульгаторов

№ п/п	Жирные кислоты	Относительное содержание, %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	$C_{12:0}$ Лауриновая кислота			
2	$C_{14:0}$ Миристиновая кислота			
3	$C_{16:0}$ Пальмитиновая кислота			
4	$C_{18:0}$ Стеариновая кислота			
5	$C_{18:1}$ (9-цис) Олеиновая кислота			
6	$C_{18:1}$ (9-транс) Элаидиновая кислота			
7	$C_{18:2}$ (9-цис, 12-цис) Линолевая кислота (ω -6 кислота)			
8	$C_{18:3}$ (9-цис, 12-цис, 15-цис) Линоленовая кислота (ω -3 кислота)			
9	$C_{20:0}$ Арахидиновая кислота			
10	$C_{22:1}$ (13-цис) Эруковая кислота			

После окончания работы проводят сравнительную оценку группового и жирнокислотного состава трех образцов эмульгаторов. В выводах подчеркивают выявленные отличия.

Лабораторная работа 8.3.2

Исследование состава коммерческих образцов лецитинов

Лецитины (эмульгатор Е322) представляют собой смесь фракций фосфатидов, получаемую из животных или растительных объектов физическими методами, с содержанием не менее 56...60 % нерастворимых в ацетоне веществ (собственно фосфолипидов).

Коммерческие образцы лецитинов выпускаются в виде трех различных форм, включающих: стандартизованные и модифицированные лецитины в масляном состоянии (жидкая форма), обезжиренные лецитины в порошкообразной и гранулированной формах, фосфолипидные фракции в маслянистой и порошкообразной формах.

В состав коммерческих образцов лецитинов, помимо фосфоглицеридной фракции, состав которой зависит от источника лецитинов, входит фракция простых липидов (глицеридов). Групповой состав и концентрация этой фракции позволяют характеризовать качество лецитинов.

Цель работы: количественное определение и идентификация простых липидов, расчет содержания фосфолипидной фракции в коммерческих образцах лецитинов.

Реактивы и материалы:

♦ Объекты исследований — коммерческие образцы лецитинов: соевый лецитин (жидкая форма), соевый лецитин (порошкообразная форма), подсолнечные фосфатидные концентраты.

♦ Ацетон.

♦ Хлороформ.

♦ Фосфорно-молибденовая кислота, 5 %-ный раствор в этаноле.

♦ Система растворителей: свежеприготовленная смесь гексана, диэтилового эфира и уксусной кислоты, взятых в объемном соотношении 80 : 20 : 1.

Методика проведения анализа. В химическом стакане вместимостью 100 см³ взвешивают с погрешностью 0,01 г около 2 г средней гомогенизированной пробы образца лецитина (жидкая форма), приливают отмеренные цилиндром 50 см³ ацетона, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и фильтруют количественно в сухую колбу через высушенный до постоянной массы беззольный фильтр. Осадок в стакане промывают до полного обезжиривания небольшими порциями (по 50 см³) ацетона, перенося их количественно на фильтр. Полноту обезжиривания контролируют по следам испарения капли фильтрата на часовом стекле (до отсутствия жирного пятна). По окончании промывания осадка колбу с фильтратом закрепляют на роторном испарителе и упаривают досуха, отгоняя ацетон при 60 °С. Остаток в колбе после упаривания, состоящий из глицеридов с примесями фосфоглицеридной фракции, повторно растворяют в 200 см³ ацетона, добавляют две капли воды и встряхивают. Раствор отфильтровывают через тот же беззольный фильтр в предварительно взвешенную колбу.

Частично отгоняют ацетон, после чего промывают беззольный фильтр с осадком до полного обезжиривания, собирая ацетоновый фильтрат в ту же самую колбу. Отгоняют ацетон и высушивают колбу с глицеридами в сушильном шкафу при температуре 100...125 °С до постоянной массы (первое взвешивание производят через 2 ч, последующие — через 1 ч).

Содержание простых липидов X_1 (%) в образце лецитина рассчитывают по формуле:

$$X_1 = \frac{m_1 \cdot 100}{m},$$

где m_1 — масса извлеченных липидов, г; m — навеска образца, г.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,5 %.

Относительное содержание фосфолипидной фракции X_2 (%) в образце лецитина определяют по формуле:

$$X_2 = 100 - X_1.$$

Анализ трех коммерческих образцов лецитинов проводят параллельно.

Результаты определения заносят в протокол и делают вывод о составе различных коммерческих образцов лецитинов и соответствии их требованиям стандартов к этому виду эмульгаторов.

Определение группового состава. Для определения группового состава простых липидов, извлеченных из коммерческого образца лецитина, остаток в колбе растворяют в расчетном количестве хлороформа для образования 2 %-ного раствора и проводят процедуру тонкослойной хроматографии.

Пластинки «Силуфол» предварительно окрашивают фосфорномолибденовой кислотой, опуская их в 5 %-ный раствор кислоты в этаноле, и затем высушивают на воздухе.

На подготовленную пластину «Силуфол» с размеченной на расстоянии 10 мм от нижнего и боковых краев пластины линией старта с помощью микрошприца наносят в виде сплошной узкой полосы длиной до 7 мм 1 мкл (10^{-6} см³) 2 %-ного хлороформного раствора глицеридов.

Разделение проводят в стеклянной камере с пришлифованной крышкой. Камеру заполняют системой растворителей до высоты не более 5 мм для того, чтобы растворитель не касался стартовой линии пластины. Пластину с нанесенным образцом помещают в камеру, вертикально погружая в разделительную смесь, и оставляют в ней до тех пор, пока высота подъема фронта растворителя не достигнет отмеченной длины разделительного пути. Разделительный путь (расстояние от линии старта до линии фронта растворителя) составляет для пластины «Силуфол» приблизительно 90 мм. После окончания хроматографического разделения пластину вынимают из камеры и сушат в горизонтальном положении до полного испарения остатков растворителей.

Проявление пластины проводят в термостате в течение 5...10 минут при температуре 60 °С. Идентификацию фракций выполняют с помощью стандартных веществ — метчиков или по значению R_f для данной системы растворителей.

Идентификацию группового состава трех коммерческих образцов лецитинов проводят параллельно.

Результаты идентификации вносят в таблицу (табл. 8.5).

Таблица 8.5

Идентификация группового состава глицеридной фракции лецитинов

№ п/п	Компоненты в составе эмульгатора	Значение R_f			
		по литератур- ным данным	исследуемых образцов эмульгаторов		
			Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	Фосфоглицериды	На старте			
2	Моноацилглицерины	0,02			
3	1,2-диацилглицерины, 1,3-диацилглицерины	0,13...0,21			
4	Свободные жирные кислоты	0,39			
5	Триацилглицерины	0,60			

Количественную оценку группового состава образцов лецитинов осуществляют на специальном приборе — денситометре, позволяющем получить результат измерений в виде графической записи (денситограммы).

При расчете концентраций компонентов, входящих в состав исследуемого образца, используют метод внутренней нормализации.

Концентрации компонентов, входящих в состав глицеридной фракции образца лецитина, определяют по денситограмме с использованием метода внутренней нормализации и вычисляют в относительных процентах по формуле (8.1), с. 200.

Результаты вычислений вносят в таблицу (табл. 8.6).

Таблица 8.6

Количественный групповой состав глицеридной фракции лецитинов

№ п/п	Компоненты в составе эмульгатора	Относительное содержание компонентов в исследуемых образцах, %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	Фосфоглицериды			
2	Моноацилглицерины			
3	1,2-диацилглицерины, 1,3-диацилглицерины			
4	Свободные жирные кислоты			
5	Триацилглицерины			

По результатам анализа группового состава глицеридной фракции коммерческих образцов лецитинов делают вывод о качестве этих эмульгаторов.

Лабораторная работа 8.3.3

Изучение свойств пищевых эмульгаторов

Основной технологической функцией эмульгатора в пищевой системе является диспергирование, проявляющееся в его способности образовывать и сохранять однородную дисперсию двух или более несмешивающихся веществ. В случае диспергирования несмешивающихся жидкостей процесс называется эмульгированием и приводит к образованию эмульсии. Агрегативная устойчивость эмульсий количественно характеризуется скоростью их расслоения или временем жизни отдельных капель в контакте с другими. В отсутствие эмульгатора устойчивость эмульсий минимальна. Образование и стабилизация эмульсий с помощью эмульгатора обеспечивается благодаря адсорбции и определенной ориентации на границе раздела фаз его молекул, имеющих дифильное строение и проявляющих поверхностно-активные свойства. Эмульгирующая способность эмульгатора характеризуется гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ): прямые эмульсии образуются в присутствии эмульгаторов, имеющих ГЛБ 8...13, обратные при величине ГЛБ 3...6.

Цель работы: исследование эмульгирующей способности пищевых эмульгаторов.

Реактивы и материалы:

- ♦ Объекты исследований: масло подсолнечное рафинированное дезодорированное.
- ♦ Вода дистиллированная.
- ♦ Коммерческие образцы эмульгаторов: моноглицериды дистиллированные (E471), эфиры лимонной кислоты и моно-, диглицеридов жирных кислот (E472 с), соевый лецитин (E322), лактилат натрия (E481).

Методика проведения анализа. В химическом стакане вместимостью 100 см³ взвешивают 0,02...2,0 г испытуемого эмульгатора с погрешностью не более 0,0001 г и приливают 30 см³ растительного масла. Содержимое стакана перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения эмульгатора в масле, подогревая, при необходимости, на водяной бане.

В охлажденный до комнатной температуры раствор эмульгатора в масле вносят 10 см^3 дистиллированной воды и гомогенизируют смесь в течение 5 минут при скорости вращения мешалки гомогенизатора примерно 2000 об/мин.

25 см^3 приготовленной эмульсии переносят в мерный цилиндр соответствующей вместимости и исследуют агрегативную устойчивость эмульсии по скорости ее расслаивания на две макрофазы. С этой целью через каждые 15 минут в течение 1 часа замеряют объем стабильной фазы и вычисляют ее процентное отношение к общему объему эмульсии (25 см^3). Результаты определений вносят в табл. 8.7.

Таблица 8.7

Влияние концентрации эмульгатора на свойства эмульсии

Название эмульгатора: _____

Расчетное значение ГЛБ: _____

№ п/п	Концентрация эмульгатора, %	Тип эмульсии	Количество устойчивой фазы эмульсии (см^3) через определенное время, мин				Устойчивость эмульсии (%) через определенное время, мин			
			15	30	45	60	15	30	45	60
1	0,05									
2	0,10									
3	0,25									
4	0,50									

Одним из расчетных методов (с. 197) определяют ГЛБ эмульгатора. Полученное значение вносят в табл. 8.7 и делают предположение о типе включающей его эмульсии. С целью экспериментального подтверждения типа эмульсии используют метод разбавления капли, которую помещают в пробирку с водой ($5...7 \text{ см}^3$). Равномерное распределение капли эмульсии в воде указывает на принадлежность последней к эмульсиям первого рода (прямым); капля обратной эмульсии водой не разбавляется.

Результаты оформляют в виде графической зависимости агрегативной устойчивости эмульсии по истечении часа (координата y) от концентрации эмульгатора (координата x).

Аналогичный эксперимент повторяют с другими эмульгаторами. Результаты исследования агрегативной устойчивости эмульсий, образованных разными эмульгаторами в концентрации 0,5 %, вносят в табл. 8.8.

По окончании исследования делается общий вывод, включающий наблюдения о типе эмульсий, стабилизированных различными эмульгаторами, и наиболее эффективном эмульгаторе.

Таблица 8.8

Влияние типа эмульгатора на свойства эмульсии

№ п/п	Эмульгатор	Тип эмульсии	Количество устойчивой фазы эмульсии (см ³) через определенное время, мин				Устойчивость эмульсии (%) через определенное время, мин			
			15	30	45	60	15	30	45	60
1	E471									
2	E472c									
3	E322									
4	E481									

8.4. ЗАГУСТИТЕЛИ И ГЕЛЕОБРАЗОВАТЕЛИ

Загустители и гелеобразователи — пищевые добавки, которые вводят в жидкие пищевые продукты для повышения вязкости или гелеобразования — формирования структурированной дисперсной системы с жидкой дисперсионной средой, заполняющей каркас, образованный частицами дисперсной фазы (гелеобразователя).

Большинство добавок этой группы относится к нейтральным или кислым полисахаридам линейного или разветвленного строения, которое и определяет особенности свойств их растворов.

Основными представителями нейтральных полисахаридов являются камедь гуара и камедь плодов рожкового дерева, проявляющие свойства загустителей.

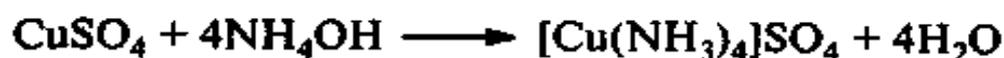
Наиболее известными представителями кислых полисахаридов, проявляющих свойства гелеобразователей, являются альгинаты, каррагинаны и пектины.

Наличие кислотных групп в составе молекул этих полисахаридов (карбоксильных — в молекулах альгинатов и пектинов, сульфатных — в молекулах каррагинанов) определяет их способность к образованию солей с катионами одновалентных металлов и к комплексообразованию (образованию циклических комплексов) с поливалентными катионами. Образование солей и комплексов с катионами металлов лежит в основе механизма гелеобразования; на реакции с катионами двухвалентных металлов основан процесс связывания и выведения из организма человека попадающих в него в виде загрязнителей ионов тяжелых металлов, например меди.

Изучение комплексообразующей способности полисахаридов по отношению к меди основано на ее фотоколориметрическом определении в форме аммиаката.

8.5. ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ

При добавлении избытка аммиака к раствору, содержащему сульфат меди, появляется интенсивное синее окрашивание, обусловленное образованием аммиаката меди с максимумом поглощения при 620 нм.



Реактивы и материалы:

- ♦ Испытуемый раствор, 0,5 %-ный.
- ♦ Аммиак 5,0 %-ный раствор.
- ♦ Сульфат меди 1,0 %-ный и 4 %-ный растворы.
- ♦ Вода.

Методика проведения анализа. К 2 см³ испытуемого раствора, содержащего медь, добавляют 1 см³ 5 %-ного водного раствора аммиака и 2 см³ воды. Содержимое пробирки встряхивают и измеряют на фотоэлектроколориметре (ФЭКе) оптическую плотность раствора при выбранном светофильтре. Расчет содержания меди в испытуемом растворе ведут по калибровочной кривой.

Выбор светофильтра. В пробирке смешивают 2 см³ 1 %-ного раствора сульфата меди, 1 см³ 5 %-ного водного раствора аммиака и 2 см³ воды. Содержимое пробирки встряхивают и измеряют интенсивность образовавшейся окраски при разных светофильтрах (длинах волн) с целью уточнения максимума поглощения. Данные заносят в таблицу (табл. 8.9), строят график изменения оптической плотности от длины волны и выбирают для работы светофильтр, при котором оптическая плотность раствора максимальна.

Таблица 8.9
Данные для построения графика
изменения оптической плотности
от длины волны

Длина вол- ны, нм	Цвет свето- фильтра	Оптическая плотность
380		
415		
500		
530		
600		
630		
720		

Построение калибровочной кривой. Из 1,0%-ного исходного раствора сульфата меди готовят растворы с меньшей концентрацией по схеме:

Раствор	Концентрация сульфата меди, мг/см ³
1. Исходный раствор	10
2. 9 см ³ (1) + 1 см ³ воды	9
3. 8 см ³ (1) + 2 см ³ воды	8
4. 7 см ³ (1) + 3 см ³ воды	7
5. 6 см ³ (1) + 4 см ³ воды	6
6. 5 см ³ (1) + 5 см ³ воды	5
7. 4 см ³ (1) + 6 см ³ воды	4
8. 3 см ³ (1) + 7 см ³ воды	3
9. 2 см ³ (1) + 8 см ³ воды	2
10. 1 см ³ (1) + 9 см ³ воды	1

Содержимое пробирок перемешивают и проводят реакцию образования аммиаката меди. Для этого отбирают 2 см³ испытуемого раствора, добавляют 1 см³ NH₄OH и 2 см³ воды. Пробирки встряхивают и измеряют интенсивность образовавшейся окраски на ФЭКе при выбранном светофилт্রে. Полученные данные записывают в таблицу (табл. 8.10) и строят калибровочную кривую. Работа по построению кривой дублируется 2...3 раза. При этом используются те же растворы сульфата меди.

Таблица 8.10

Данные для построения калибровочной кривой

Номер пробирки	CuSO ₄ , мг/см ³	Оптическая плотность (A)	Примечание

8.6. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 8.6.4

Изучение комплексообразующей способности пектинов

Важная роль пектина в питании человека связана с его способностью связывать ионы тяжелых металлов и выводить их из организма (поскольку пектин не усваивается организмом человека).

Способность пектиновых молекул связывать поливалентные катионы увеличивается при повышении содержания и степени диссоциации

ции свободных карбоксильных групп в молекуле (низкоэтерифицированные пектины в кислой среде) и не одинакова по отношению к катионам различных металлов.

К числу тяжелых металлов, которые могут загрязнять пищевые продукты, относится медь. Связывание меди в реакции комплексообразования с пектином лежит в основе профилактики возможных последствий ее попадания в организм человека.

Цель работы: определение комплексообразующей способности пектинов по отношению к меди в сравнении с нейтральными полисахаридами и белком.

Реактивы и материалы:

- ♦ Аммиак 5 %-ный раствор.
- ♦ Пектин 0,5 %-ный раствор.
- ♦ Белок 0,5 %-ный раствор.
- ♦ Сульфат меди 1,0 %-ный и 4 %-ный растворы.
- ♦ Крахмал 1,0 %-ный раствор.
- ♦ Вода.

Методика проведения анализа. В основе определения комплексообразующей способности исследуемого вещества по отношению к меди лежит фотоколориметрическое определение последней в форме аммиаката меди, который имеет интенсивное синее окрашивание с максимумом поглощения при 620 нм и образуется при добавлении избытка аммиака к раствору, содержащему сульфат меди по реакции:



Выбор светофильтра. В пробирке смешивают 2 см³ 1 %-ного раствора сульфата меди, 1 см³ 5 %-ного водного раствора аммиака и 2 см³ воды. Содержимое пробирки встряхивают и измеряют интенсивность образовавшейся окраски при разных светофильтрах (длинах волн) с целью уточнения максимума поглощения. Данные заносят в таблицу (табл. 8.11), строят график изменения оптической плотности от длины волны и выбирают для работы светофильтр, при котором оптическая плотность раствора максимальна.

Таблица 8.11
Данные для построения графика
изменения оптической плотности
от длины волны

Длина-волны, нм	Цвет светофильтра	Оптическая плотность
380		
415		
500		
530		
600		
630		
720		

Построение калибровочной кривой. Из 1,0 %-ного исходного раствора сульфата меди готовят растворы с меньшей концентрацией по схеме:

Раствор	Концентрация сульфата меди, мг/см ³
1. Исходный раствор	10
2. 9 см ³ (1) + 1 см ³ воды.....	9
3. 8 см ³ (1) + 2 см ³ воды.....	8
4. 7 см ³ (1) + 3 см ³ воды.....	7
5. 6 см ³ (1) + 4 см ³ воды.....	6
6. 5 см ³ (1) + 5 см ³ воды.....	5
7. 4 см ³ (1) + 6 см ³ воды.....	4
8. 3 см ³ (1) + 7 см ³ воды.....	3
9. 2 см ³ (1) + 8 см ³ воды.....	2
10. 1 см ³ (1) + 9 см ³ воды.....	1

Содержимое пробирок перемешивают и проводят реакцию образования аммиаката меди. Для этого отбирают 2 см³ испытуемого раствора, добавляют 1 см³ раствора аммиака и 2 см³ воды. Пробирки встряхивают и измеряют интенсивность образовавшейся окраски на ФЭК при выбранном светофильтре. Полученные данные записывают в таблицу (табл. 8.12) и строят калибровочную кривую. Работа по построению кривой дублируется 2...3 раза. При этом используются те же растворы сульфата меди.

Таблица 8.12

Данные для построения калибровочной кривой

Номер пробирки	CuSO ₄ , мг/см ³	Оптическая плотность (A)	Примечание

Определение способности пектина связывать ионы меди

В ряд пробирок вносят испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 8.13.

Содержимое пробирок перемешивают. Образующиеся в них осадки отделяют фильтрованием и измеряют на ФЭКе при выбранном светофильтре оптическую плотность каждого образца фильтрата. Результаты измерений вносят в табл. 8.13. Расчет содержания меди ведут по калибровочной кривой.

Таблица 8.13

Результаты измерения оптической плотности растворов

№ п/п	CuSO ₄ , 4,0 %, см ³	Пектин, 0,5 %, см ³	Вода, см ³	Оптическая плотность (A)	Количество связанной меди, мг
1	1	0,0	4,0		
2	1	0,5	3,5		
3	1	1,0	3,0		
4	1	2,0	2,0		
5	1	3,0	1,0		

Определение способности белка связывать ионы меди

В ряд пробирок вносят испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 8.14.

Таблица 8.14

Результаты измерения оптической плотности растворов

№ п/п	CuSO ₄ , 4,0 %, см ³	Белок, 0,5 %, см ³	Вода, см ³	Оптическая плотность (A)	Количество связанной меди, мг
1	1	0,0	4,0		
2	1	0,5	3,5		
3	1	1,0	3,0		
4	1	2,0	2,0		
5	1	3,0	1,0		

Содержимое пробирок перемешивают и фильтруют. Измеряют оптическую плотность фильтратов, результаты измерений вносят в табл. 8.14. По калибровочной кривой рассчитывают количество меди, связанное с белком.

Определение способности смеси белка и пектина связывать ионы меди

В ряд пробирок вносят испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 8.15.

Содержимое пробирок фильтруют и для каждого фильтрата по интенсивности окраски аммиаката меди измеряют оптическую плот-

Таблица 8.15

Результаты измерения оптической плотности растворов

№ п/п	CuSO ₄ , 4,0 %, см ³	Пектин, 0,5 %, см ³	Белок, 0,5 %, см ³	Вода, см ³	Оптическая плотность (A)	Количество свя- занной меди, мг
1	1,0	1,0	0,0	3,0		
2	1,0	1,0	0,5	2,5		
3	1,0	1,0	1,0	2,0		
4	1,0	1,0	1,5	1,5		
5	1,0	1,0	2,0	1,0		
6	1,0	0,0	1,0	3,0		
7	1,0	0,5	1,0	2,5		
8	1,0	1,0	1,0	2,0		
9	1,0	2,0	1,0	1,0		
10	1,0	3,0	1,0	0,0		
11	1,0	0,0	0,0	4,0		

ность. Результаты измерений вносят в табл. 8.15. Расчет ведут по калибровочной кривой.

Способность крахмала связывать ионы меди

В ряд пробирок вносят испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 8.16.

Таблица 8.16

Результаты измерения оптической плотности растворов

№ п/п	CuSO ₄ , 4,0 %, см ³	Крахмал 1 %, см ³	Вода, см ³	Оптическая плотность (A)	Количество свя- занной меди, мг
1	1	0	4		
2	1	1	3		
3	1	2	2		
4	1	3	1		
5	1	4	0		

Содержимое пробирок встряхивают, при необходимости фильтруют и в фильтратах определяют содержание ионов меди по принятой методике.

На основании полученных результатов делают вывод о способности разных соединений взаимодействовать с ионами меди. Сравнивают связывающую способность пектина, белка и их смеси. Делают графические построения.

8.7. КОНСЕРВАНТЫ

Консерванты — пищевые добавки, которые вводят в пищевые продукты для увеличения сроков их хранения путем защиты от порчи, вызываемой микроорганизмами.

Эффективность и способы применения консервантов зависят от их химической природы, концентрации и особенностей состава, например рН пищевой системы, в которую их вводят. При выборе консерванта предпочтение отдается тому, который обладает наиболее широким спектром антимикробного действия.

Наиболее часто в качестве пищевых консервантов используются:

- ♦ сорбиновая кислота (E200) и ее соли: сорбат натрия (E201), сорбат калия (E202), сорбат кальция (E203);
- ♦ бензойная кислота (E210) и ее соли: бензоат натрия (E211), бензоат калия (E212), бензоат кальция (E213).

Определение содержания этих консервантов основано на хроматографических методах, включающих тонкослойную и высокоэффективную жидкостную хроматографии.

8.8. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕНЗОЙНОЙ И СОРБИНОВОЙ КИСЛОТ

Настоящие методы распространяются на определение бензойной и сорбиновой кислот, добавленных в пищевое сырье, продукты и напитки в качестве консервантов.

Метод тонкослойной хроматографии

Метод основан на извлечении бензойной кислоты (БК) и сорбиновой кислоты (СК) из пищевых продуктов перегонкой с паром или экстракцией органическим растворителем с последующим хроматографическим разделением их в тонком слое сорбента, элюированием

(извлечением вещества вымыванием подходящим растворителем — элюентом) и измерением оптической плотности полученных элюатов.

Реактивы и материалы:

♦ Стандартные растворы:

— *раствор 1*: отвешивают 100 мг бензойной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят до метки этилацетатом (концентрация полученного раствора 4 мг/см³);

— *раствор 2*: отвешивают 40 мг сорбиновой кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки этилацетатом (концентрация полученного раствора 0,4 мг/см³);

— *раствор 3*: смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Концентрация БК в полученном растворе 2,0 мг/см³, СК — 0,2 мг/см³.

♦ Na₂SO₄ безводный.

♦ H₂SO₄, 1 М и 0,5 М растворы.

♦ NaOH, 1 М раствор.

♦ Этилацетат.

♦ Система растворителей: петролейный эфир-хлороформ-диэтиловый эфир-муравьиная кислота, в отношении объемов 20,0:8,0:2,8:1,2.

♦ Реагенты для обнаружения сорбиновой и бензойной кислот в тонком слое: растворы хлорного железа, пероксида водорода, K₂Cr₂O₇ в H₂SO₄ и 2-тиобарбитуровой кислоты.

♦ Элюент для высокожидкостной хроматографии: изооктан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (100:12:0,1).

Методика проведения анализа. Хроматографический анализ включает несколько этапов: выделение бензойной и сорбиновой кислот, хроматографическое разделение в тонком слое, идентификацию и подтверждение наличия бензойной и сорбиновой кислот, количественное определение бензойной и сорбиновой кислот.

8.8.1. Выделение бензойной и сорбиновой кислот

Пробу пищевого продукта (за исключением напитков) массой около 10 г отвешивают с точностью до 0,01 г, измельчают и гомогенизируют с добавкой 25 г Na₂SO₄ и 40 см³ 1 М раствора H₂SO₄. Полученную гомогенную массу переносят в колбу вместимостью 1 л, соединенную с парообразователем, и нагревают. В момент, когда жидкость в колбе начинает закипать, закрывают парообразователь пробкой и отгоняют БК и СК с паром, собирая около 80 см³ дистиллята в приемник, содержащий 10 см³ 1 М раствора NaOH. Дистиллят переносят в делитель

ную воронку, насыщают Na_2SO_4 (на 10 см^3 дистиллята добавляют 6 г Na_2SO_4), подкисляют 1 М раствором H_2SO_4 до pH 2,0...3,0 и экстрагируют этилацетатом трижды по 10 см^3 . Объединенный экстракт сушат, добавляя 2 г прокаленного безводного Na_2SO_4 . Этот экстракт обозначают V_1 . Экстракт упаривают на роторном испарителе (допускается упаривание в фарфоровой чашке на песчаной бане) до объема 1 см^3 .

При анализе напитков исключают стадию отгонки, 10 см^3 напитка разбавляют вдвое 0,5 М H_2SO_4 , добавляя 10 г Na_2SO_4 , интенсивно перемешивают и экстрагируют БК и СК 3 раза по 5 см^3 этилацетатом. Объединенный экстракт (V_1) сушат 1 г безводного прокаленного Na_2SO_4 . Экстракт упаривают на роторном испарителе или в фарфоровой чашке до конечного объема 1 см^3 .

Хроматографическое разделение в тонком слое

Готовят смесь растворителей, включающую петролейный эфир, хлороформ, диэтиловый эфир и муравьиную кислоту в соотношении объемов 20,0:8,0:2,8:1,2 соответственно и заливают в камеру для тонкослойной хроматографии. Пластинку «Силуфол УФ 254» размечают мягким простым карандашом, определяя на линии старта шесть зон длиной 2...3 мм для нанесения исследуемых растворов. На разметки 1, 2, 5, 6 наносят по 1, 2, 4 и 8 мкл раствора 3, при этом количество БК в них составляет 2, 4, 8 и 16 мкг, а СК — 0,2; 0,4; 0,8 и 1,6 мкг соответственно. На разметки 3 и 4 наносят 3 и 10 мкл экстракта. Нанесение проб проводят микрошприцем или калиброванным капилляром, постоянно подсушивая, например, поддувом воздухом с помощью фена. Пластинку опускают в камеру и хроматографируют до 15 см от линии старта. Затем пластинку вынимают, подсушивают и рассматривают в УФ-свете с волной 254 нм. Наличие в хроматограмме экстракта темных пятен, совпадающих по значению R_f с соответствующим стандартом, свидетельствует о присутствии этих консервантов в анализируемом образце. Пятна в экстракте сравнивают с пятнами стандартов визуально и ориентировочно оценивают содержание бензойной и сорбиновой кислот в пробе. Темные пятна в экстракте и стандартах обводят карандашом в УФ-свете.

Идентификация и подтверждение наличия бензойной и сорбиновой кислот

Для обнаружения бензойной кислоты высушенную пластинку разрезают между 3 и 4 стартовыми зонами. Одну часть опрыскивают

раствором хлорного железа, а затем — пероксида водорода и нагревают 2 мин при 80...100 °С в сушильном шкафу. Появление буро-фиолетовой окраски пятен на хроматограмме экстракта, по цвету и R_f соответствующих пятнам в стандарте БК, подтверждает наличие БК в пробе.

Для обнаружения сорбиновой кислоты вторую часть пластинки опрыскивают раствором $K_2Cr_2O_7$ в H_2SO_4 , подсушивают, опрыскивают раствором 2-тиобарбитуровой кислоты и нагревают 5 мин при 100 °С в сушильном шкафу. Появление малиновой окраски пятен на хроматограмме экстракта, по цвету и R_f соответствующих пятнам в стандарте СК, подтверждает ее наличие в пробе.

Количественное определение бензойной и сорбиновой кислот

Пластинку «Силуфол» размечают мягким простым карандашом и наносят на линию стартовых зон точно фиксированное количество опытной пробы (в пределах 1...8 мкл), «холостой» пробы (15 см³ этилацетата, упаренного до объема опытной пробы) и раствора 3 стандартов. Количество пробы раствора 3 устанавливается с учетом предварительной оценки содержания БК и СК в опытной пробе (но не более 5 мкг СК). Пластинку подсушивают и помещают в предварительно подготовленную хроматографическую камеру с системой растворителей. После прохождения фронтом растворителей около 15 см от линии старта, пластинку вынимают, подсушивают и рассматривают в УФ-свете. Обводят карандашом темные пятна БК и СК в опытной пробе и стандартах и соответствующие зоны в «холостой» пробе. Обведенные зоны вырезают и помещают в пробирки, куда заливают по 3 см³ этилацетата. Пробирки закрывают пробками и встряхивают, затем элюаты сливают в кварцевые кюветы и измеряют оптическую плотность опытной пробы и стандартов против «холостой» пробы.

При определении количества только одного из консервантов, анализ выполняют по описанной выше методике с тем отличием, что при количественном определении только бензойной кислоты для сравнения используют стандартный раствор 1, а в случае сорбиновой кислоты — стандартный раствор 2.

Содержание бензойной и сорбиновой кислот в продукте (мг/кг или мг/л) рассчитывают по формуле:

$$C = 1000 KF \cdot \frac{H_0 V_1 m}{H_{ст} V_2 M}$$

где 1000 — коэффициент, учитывающий разведение стандарта; K — коэффициент, учитывающий потери при извлечении, равный при перегонке с паром и экстракции для БК — 1,2, для СК — 1,25; F — коэффициент разведения элюата перед измерением оптической плотности; H_0 — оптическая плотность опытной пробы относительно «холстой»; $H_{ст}$ — оптическая плотность стандарта относительно «холстой»; V_1 — объем экстракта, см³; V_2 — объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл; M — масса продукта, взятого на анализ, г; m — количество стандарта, нанесенного на пластинку, мкг.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое от двух параллельных определений. Относительные допустимые расхождения результатов определения зависят от содержания консерванта в пробе анализируемого образца и не должны превышать значения, указанные в табл. 8.17.

Таблица 8.17

Допустимые расхождения результатов определения содержания бензойной и сорбиновой кислот в продукте (в %)

Содержание, мг/кг	Бензойная кислота	Сорбиновая кислота
До 300	20	20
Свыше 300	15	15

Количественное определение бензойной и сорбиновой кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Экстракт, содержащий выделенные бензойную и сорбиновую кислоты, и раствор стандарта 3 поочередно вводят в жидкостный хроматограф «Милихром» с колонкой 60×2 мм, (неподвижная фаза — «Силасорб 600», 5 мкм) при следующих условиях работы: состав элюента — изооктан-диэтиловый эфир-уксусная кислота 100:12:0,1, расход элюента 200 мкл/мин, детектирование в УФ-спектре при 254 нм, объем видимой пробы 10 мкл, скорость ленты самописца ЛКС — 4 300 мм/ч.

На хроматограмме экстракта идентифицируют пики БК и СК по времени удерживания стандартов: для БК — 3,4 мин, для СК — 4,4 мин.

Для подтверждения правильности идентификации аликвоты раствора 3 и экстракта вводят в тех же условиях повторно, регистрируя в максимумах хроматографических пиков спектр поглощения БК (250...270 нм) и СК (230...270 нм). БК имеет три максимума поглощения в указанном интервале спектра — 268, 270 и 272 нм, а СК — один —

254 нм, что является дополнительным идентификационным признаком для подтверждения присутствия их в образце.

Измеряют высоту пиков стандартов БК и СК на хроматограммах и рассчитывают их содержание в мг/кг или мг/дм³ по формуле:

$$C = 1000 K \cdot \frac{H_0 V_1 P}{H_{ст} M},$$

где K — коэффициент, учитывающий потери при извлечении, равный при перегонке с паром и экстракции для БК — 1,2, для СК — 1,25; P — коэффициент БК и СК в растворе стандарта (раствор 3), мг/см³; H_0 — высота пика БК и СК на хроматограмме экстракта, мм; $H_{ст}$ — высота пика БК и СК на хроматограмме стандартов, мм; V_1 — объем экстракта, см³; M — масса продукта, взятого на анализ, г.

Вычисление проводят до второго десятичного знака.

За конечный результат испытаний принимают среднее арифметическое двух параллельных определений.

Окончательный результат округляют до первого десятичного знака.

Относительные допустимые расхождения результатов определения не должны превышать 15 %.

8.9. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 8.9.5

Идентификация и определение консервантов в маргариновой продукции методом тонкослойной хроматографии

Метод основан на извлечении бензойной кислоты (БК) и сорбиновой кислоты (СК) из двух промышленных образцов маргарина перегонкой с паром с последующим хроматографическим разделением на тонком слое сорбента, элюированием и измерением оптической плотности полученных элюатов.

Реактивы и материалы:

♦ Объекты исследований — промышленные образцы маргарина 82 % и 60 %-ной жирности.

♦ Стандартные растворы:

— *раствор 1*: отвешивают 100 мг бензойной кислоты, переносят мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят до метки этилацетатом (концентрация полученного раствора 4 мг/см³);

— *раствор 2*: отвешивают 40 мг сорбиновой кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки этилацетатом (концентрация полученного раствора 0,4 мг/см³);

— *раствор 3*: смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Концентрация БК в полученном растворе 2,0 мг/см³, СК — 0,2 мг/см³.

♦ Na₂SO₄ безводный.

♦ H₂SO₄, 1 М и 0,5 М растворы.

♦ NaOH, 1 М раствор.

♦ Этилацетат.

♦ Система растворителей: петролейный эфир — хлороформ — диэтиловый эфир — муравьиная кислота, в отношении объемов 20,0 : 8,0 : 2,8 : 1,2.

♦ Реагенты для обнаружения сорбиновой и бензойной кислот в тонком слое: растворы хлорного железа, пероксида водорода, K₂Cr₂O₇ в H₂SO₄ и 2-тиобарбитуровой кислоты.

Методика проведения анализа. Выделение консервантов из образцов маргаринов. Пробу маргарина 82 %-ной жирности массой около 10 г отвешивают с точностью до 0,01 г, измельчают и гомогенизируют с добавкой 25 г Na₂SO₄ и 40 см³ 1 М раствора H₂SO₄. Полученную гомогенную массу переносят в колбу вместимостью 1 л, соединенную с парообразователем, и нагревают. В момент, когда жидкость в колбе начинает закипать, закрывают парообразователь пробкой и осуществляют перегонку с паром, собирая около 80 см³ дистиллята в приемник, содержащий 10 см³ 1 М раствора NaOH. Дистиллят переносят в делительную воронку, насыщают Na₂SO₄ (на 10 см³ дистиллята добавляют 6 г Na₂SO₄), подкисляют 1 М раствором H₂SO₄ до pH 2,0...3,0 и экстрагируют этилацетатом трижды по 10 см³. Объединенный экстракт сушат, добавляя 2 г прокаленного безводного Na₂SO₄. Этот экстракт обозначают V₁. Экстракт упаривают на роторном испарителе до объема 1 см³.

Повторяют процедуру выделения консервантов из образца маргарина 60 %-ной жирности.

Хроматографическое разделение в тонком слое. Готовят смесь растворителей, включающую петролейный эфир, хлороформ, диэтиловый эфир и муравьиную кислоту в соотношении объемов 20,0 : 8,0 : 2,8 : 1,2 соответственно и заливают в камеру для тонкослойной хроматографии. Пластинку «Силуфол УФ 254» размечают мягким простым карандашом, определяя на линии старта восемь зон длиной около 2 мм для нанесения исследуемых растворов. На разметки 1, 2, 7, 8 наносят по 1, 2, 4 и 8 мкл раствора 3, при этом количество

БК в них составляет 2, 4, 8 и 16 мкг, а СК — 0,2; 0,4; 0,8 и 1,6 мкг соответственно. На разметки 3 и 4 наносят 3 и 10 мкл экстракта из первого образца маргарина, на разметки 5 и 6 — экстракта из второго образца маргарина. Нанесение проб проводят микрошприцем или калиброванным капилляром, постоянно подсушивания, например, поддувом воздухом с помощью фена. Пластинку опускают в камеру и хроматографируют до 15 см от линии старта. Затем пластинку вынимают, подсушивают и рассматривают в УФ-свете с волной 254 нм. Наличие в хроматограмме экстракта темных пятен, совпадающих по значению R_f с соответствующим стандартом, свидетельствует о присутствии этих консервантов в анализируемом образце. Пятна в экстракте сравнивают с пятнами стандартов визуально и ориентировочно оценивают содержание бензойной и сорбиновой кислот в пробе. Темные пятна в экстракте и стандартах обводят карандашом в УФ-свете.

Идентификация и подтверждение наличия бензойной и сорбиновой кислот. Для обнаружения бензойной кислоты высушенную пластинку разрезают между 5 и 6 стартовыми зонами. Одну часть опрыскивают раствором хлорного железа, а затем — пероксида водорода и нагревают 2 мин при 80...100 °С в сушильном шкафу. Появление буро-фиолетовой окраски пятен на хроматограмме экстракта, по цвету и R_f соответствующих пятнам в стандарте БК, подтверждает наличие БК в пробе.

Для обнаружения сорбиновой кислоты вторую часть пластинки опрыскивают раствором $K_2Cr_2O_7$ в H_2SO_4 , подсушивают, опрыскивают раствором 2-тиобарбитуровой кислоты и нагревают 5 мин при 100 °С в сушильном шкафу. Появление малиновой окраски пятен на хроматограмме экстракта, по цвету и R_f соответствующих пятнам в стандарте СК, подтверждает ее наличие в пробе.

Количественное определение бензойной и сорбиновой кислот. Пластинку «Силуфол» размечают мягким простым карандашом и наносят на линию стартовых зон точно фиксированное количество опытной пробы (в пределах 1...8 мкл) каждого образца маргарина, «холостой» пробы (15 см³ этилацетата, упаренного до объема опытной пробы) и раствора 3 стандартов. Количество пробы раствора 3 устанавливается с учетом предварительной оценки содержания БК и СК в опытных пробах (но не более 5 мкг СК). Пластинку подсушивают и помещают в предварительно подготовленную хроматографическую камеру с системой растворителей. После прохождения фронтом растворителей около 15 см от линии старта пластинку вынимают, подсушивают и рассматривают в УФ-свете. Обводят

карандашом темные пятна БК и СК в опытных пробах и стандартах и соответствующие зоны в «холостой» пробе. Обведенные зоны вырезают и помещают в пробирки, куда заливают по 3 см³ этилацетата. Пробирки закрывают пробками и встряхивают, затем элюаты сливают в кварцевые кюветы и измеряют оптическую плотность опытных проб стандартов против «холостой» пробы.

Содержание бензойной и сорбиновой кислот в продукте (мг/кг или мг/л) рассчитывают по формуле:

$$C = 1000KF \cdot \frac{H_0 V_1 m}{H_{ст} V_2 M},$$

где 1000 — коэффициент, учитывающий разведение стандарта; K — коэффициент, учитывающий потери при извлечении, равный при перегонке с паром и экстракции для БК — 1,2, для СК — 1,25; F — коэффициент разведения элюата перед измерением оптической плотности; H_0 — оптическая плотность опытной пробы относительно «холостой»; $H_{ст}$ — оптическая плотность стандарта относительно «холостой»; V_1 — объем экстракта, см³; V_2 — объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл; M — масса продукта, взятого на анализ, г; m — количество стандарта, нанесенного на пластинку, мкг.

Результаты расчетов заносят в таблицу (табл. 8.18).

Таблица 8.18

Содержание бензойной и сорбиновой кислот в продукте (в мг/кг)

Образец маргарина	Бензойная кислота	Сорбиновая кислота
Маргарин 82 %-ной жирности		
Маргарин 60 %-ной жирности		

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое от двух параллельных определений.

По окончании исследования делается общий вывод, включающий заключение о наличии консервантов в составе разных промышленных образцов маргаринов, их химической природе и дозировке.

Контрольные вопросы

1. Какие вещества обладают поверхностной активностью? Чем она объясняется и от чего зависит?
2. Каким методом определяется фракционный состав моноглицеридов? Перечислить основные реакции.

3. Какой метод лежит в основе определения фосфолипидных фракций?
4. Определите содержание лецитина в образце фосфатидов, если массовая доля связанного фосфора в нем составляет 0,4 %.
5. Какие системы называются эмульсиями и по каким признакам их классифицируют?
6. Что является мерой устойчивости эмульсии и как она определяется?
7. Какие типы эмульсии вам известны? Какие эмульгаторы используют для их образования и стабилизации? Как определить тип эмульсии?
8. Постройте графическую зависимость агрегативной устойчивости эмульсии от времени, если известно, что каждые 10 мин агрегативная устойчивость эмульсии снижалась на 25 %, а время полного расслоения эмульсии составило 40 мин.
9. На каких свойствах полисахаридов основано их применение в пищевых продуктах?
10. Какой метод лежит в основе определения комплексообразующей способности полисахаридов? У каких полисахаридов проявляется эта способность?
11. Для каких целей при определении комплексообразующей способности пектина используется раствор аммиака?
12. На каком методе основано определение содержания консервантов в пищевых продуктах? В чем состоят отличия их определения в твердых и жидких продуктах?
13. Каким образом можно различить бензойную и сорбиновую кислоты?
14. Какие коэффициенты используются в расчетной формуле, по которой определяется содержание бензойной и сорбиновой кислот?

ВОДА

Вода, не являясь питательным веществом, жизненно необходима как стабилизатор температуры тела, переносчик нутриентов и пищеварительных метаболитов, реагент и реакционная среда в ряде химических и биохимических превращений.

Вода — важная составляющая пищевых продуктов. Она присутствует в растительных и животных продуктах как клеточный и внеклеточный компонент, как диспергирующая среда и растворитель, обуславливая их консистенцию и структуру и влияя на внешний вид, вкус и устойчивость продукта при хранении. При этом имеет значение не только общее содержание влаги, а наличие доступной влаги для превращений. Влага может быть связанной и свободной.

В обеспечении устойчивости продукта при хранении важную роль играет состояние свободной и связанной влаги.

Свободная влага — это влага, не связанная с полимерными компонентами и доступная для протекания биохимических, химических и микробиологических реакций, замерзающая при 0 °С.

Связанная влага — это ассоциированная вода, прочно связанная с различными компонентами: белками, липидами и углеводами за счет химических и физических связей. Эта влага не замерзает даже при -40 °С.

Столь различные температуры замерзания лежат в основе методов определения свободной и связанной влаги.

Для характеристики влияния влаги на порчу продукта введен термин «активность воды» — это отношение давления паров воды над данным продуктом к давлению паров над чистой водой при одной и той же температуре.

$$a_w = \frac{P_w}{P_0}$$

где a_w — «активность воды»; P_w — давление паров воды над данным продуктом; P_0 — давление паров над чистой водой.

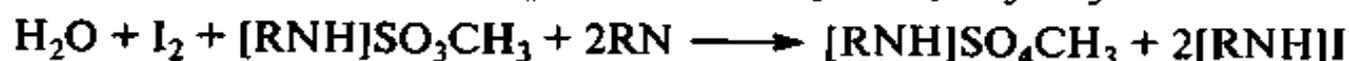
9.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЛАГИ

9.1.1. Определение общего содержания влаги методом высушивания до постоянной массы

Содержание влаги рассчитывают по разности массы образца до и после высушивания в сушильном шкафу при температуре 100...105 °С. Это — стандартный метод определения влаги в теххимическом контроле пищевых продуктов. Поскольку в основе метода лежит высушивание образца до постоянной массы, метод требует много времени для проведения анализа.

9.1.2. Определение общего содержания влаги методом титрования по модифицированному методу Карла Фишера

В титровании по методу К. Фишера вода определяется с помощью специфической химической реакции, которая протекает в две стадии:



Сначала, метанол служит для пробы растворителем или диспергирующим средством, с помощью диоксида серы он подвергается этерификации до метилсернистой кислоты. Образовавшийся метилсульфит окисляется йодом до метилсульфата. При этом для доведения реакции до конца в смесь добавляют имидазол. Для проведения этой реакции необходима вода в стехиометрическом количестве. Конец анализа определяют по прекращению расхода йода. Это видно по появлению коричневого трийодида, который больше не восстанавливается.

Для фиксирования конечной точки титрования (к. т. т.) используется электрометрическая индикация: бипотенциометрия или биамперометрия.

В случае бипотенциометрической индикации конечной точки титрования между электродами, опущенными в титровальную камеру, пропускают ток постоянной силы и одновременно измеряют напряжение, необходимое для его поддержания. При этом в к. т. т. происходит падение напряжения.

При биамперометрическом способе фиксирования к. т. т. создают постоянное напряжение между электродами и измеряют силу тока,

необходимую для его поддержания. В этом случае в к.т.т. произойдет скачкообразное увеличение силы тока.

На результаты анализа могут оказывать влияние ряд факторов: температура, продолжительность экстракции влаги из образца, степень измельчения образца, длительность титрования, полярность реакционной среды.

9.1.3. Определение влажности пищевых продуктов с применением ИК-сушки

Под инфракрасным излучением принято понимать невидимую глазом область излучения с длиной электромагнитных волн от 0,76 до 400...500 мк.

ИК-лучи отличаются от других электромагнитных колебаний частотой, длиной и скоростью распространения волн. Тепловое воздействие ИК-лучей объясняется двойственностью электромагнитного поля или волновой природой квантов. При этом источник излучения создает электромагнитное поле, служащее носителем энергии; тепловая энергия передается с помощью этого поля и поглощается предметами окружающей среды (т. е. атомами поглощающего вещества). При поглощении энергии повышается уровень собственных колебаний атомов, что означает превращение энергии излучения в тепловую энергию. От общего количества подводимой к облучаемому предмету энергии излучения в единицу времени одна часть поглощается, другая часть отражается и третья часть пропускается телом. Большинство влажных продуктов обладает высокой способностью к поглощению; она зависит, однако, от строения поверхности, химического состава и формы тела.

Особенностью применения ИК-излучения в пищевой промышленности для процессов, связанных с прогревом материалов (в частности сушки), является проникновение в них на некоторую глубину лучистого потока. Глубина проникновения ИК-лучей в прогреваемый материал зависит от его свойств, структуры и характера поверхности, степени измельчения материала, а также от длины волны излучения, температуры и длительности воздействия. Особенностью передачи тепла материалам, нагреваемым ИК-излучением, по сравнению с конвективной передачей, является возможность создания во много раз большей плотности потока тепла, что позволяет достичь значительно больших скоростей прогрева материала.

Источниками ИК-излучения являются тела, нагретые до соответствующей температуры. Чем выше температура нагрева определенного тела, тем меньше длина волны излучения и, соответственно, тем больше глубина проникновения в продукт инфракрасных лучей.

9.1.4. Определение свободной и связанной влаги методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Если образец охладить до температуры меньше 0°C , то свободная влага замерзнет, связанная — нет. При нагревании замороженного образца в калориметре можно измерить тепло, потребляемое при таянии льда. Незамерзающая вода определяется как разница между общей и замерзающей водой.

9.1.5. Определение свободной и связанной влаги термогравиметрическим методом

Метод основан на определении скорости высушивания. В контролируемых условиях граница между областью постоянной скорости высушивания и областью, где эта скорость снижается, характеризует связанную влагу.

9.1.6. Определение свободной и связанной влаги на основе диэлектрических измерений

Метод основан на том, что при 0°C значения диэлектрической проницаемости воды и льда примерно равны. Но если часть влаги связана, то ее диэлектрические свойства должны сильно отличаться от диэлектрических свойств объемной воды и льда.

9.1.7. Определение свободной и связанной влаги на основе измерения теплоемкости

Теплоемкость воды больше, чем теплоемкость льда, т. к. с повышением температуры в воде происходит разрыв водородных связей. Это

свойство используют для изучения подвижности молекул воды. Значение теплоемкости воды в зависимости от ее содержания в полимерах дает сведения о количестве связанной воды. Если при низких концентрациях вода специфически связана, то ее вклад в теплоемкость мал. В области высоких значений влажности ее в основном определяет свободная влага, вклад которой в теплоемкость примерно в 2 раза больше, чем льда.

9.1.8. Определение свободной и связанной влаги методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР)

Метод заключается в изучении подвижности воды в неподвижной матрице. При наличии свободной и связанной влаги получают две линии в спектре ЯМР вместо одной для объемной воды.

Чаще всего для анализа содержания воды в пищевых продуктах применяют метод определения потери массы при сушке, например, в сушильном шкафу, в микроволновом и ИК-излучениях. Однако с помощью этих методов невозможно определить содержание прочносвязанной воды, кроме того, с одной стороны, в процессе сушки из пробы удаляется не только влага, но и другие летучие компоненты; с другой стороны, могут образовываться дополнительные соединения.

9.1.9. Определение активности воды на автоматическом приборе «Аквалаб»

В основе определения активности воды на приборе «Аквалаб» лежит метод определения точки росы на охлажденном зеркале, которое, в свою очередь, основано на измерении температуры. Главным преимуществом метода является скорость и точность: точные измерения можно получить менее чем за 5 минут.

Образец помещают в специальную чашечку прибора «Аквалаб» (AQUALAB), которую устанавливают и запечатывают напротив блока сенсора. Внутри блока сенсора находятся: «сенсор точки росы и температуры», инфракрасный термометр и вентилятор. «Сенсор точки росы» измеряет температуру точки росы воздуха, а инфракрасный термометр — температуру образца. По данным этих измерений на ком-

пьютере рассчитывают относительную влажность свободного пространства как отношение давления пара насыщения при температуре точки росы к давлению пара насыщения при температуре образца.

Когда активность воды исследуемого образца и относительная влажность воздуха находятся в равновесии, влажность свободного пространства будет равна активности воды образца.

Назначение вентилятора — ускорить установление равновесия и контролировать электропроводность пограничного слоя «сенсора точки росы».

9.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 9.2.1

Определение влажности по методу Карла Фишера

Метод основан на использовании реакции окисления-восстановления с участием йода и диоксида серы, которая протекает в присутствии воды. Использование специально подобранных органических реагентов позволяет достигнуть полного извлечения воды из пищевого продукта, а использование в качестве органического основания имидазола способствует практически полному протеканию реакции. Содержание влаги в продукте рассчитывается по количеству йода, затраченному на титрование. Метод отличается высокой точностью и стабильностью результатов (в том числе при очень низком содержании влаги) и быстротой проведения анализа.

Аппаратура, материалы, реактивы:

- ♦ Автоматический титратор «701 KF Titrino».
- ♦ Весы аналитические; патрон для взвешивания образца.
- ♦ Реактив Фишера.

Подготовка пробы для анализа:

- а) зерно, хлеб, кофе и т. п. продукты необходимо измельчить на лабораторной мельнице;
- б) мука и другие порошкообразные продукты предварительной подготовки не требуют.

Определение титра реактива Карла Фишера по воде. Перед проведением анализа содержания влаги в пищевых продуктах необходимо определить титр реактива К. Фишера по воде.

Титр — это количество мг воды, эквивалентное 1 см³ реактива К. Фишера.

$$T = \frac{m_B}{V},$$

где m_B — масса воды, мг; V — объем реактива К. Фишера, см³.

Для определения титра необходимо провести не менее 10 параллельных определений и рассчитать его среднее значение.

Определение титра производится в следующем порядке:

1. Нажмите кнопку «STOP», на дисплее прибора Titrino появится надпись «Titer», затем нажмите кнопку «MODE» до появления на дисплее надписи «Titer with H₂O or std.»

2. Нажмите кнопку «ENTER», на дисплее появится надпись «Titer». Прибор готов к работе в режиме определения титра.

3. Заполните ячейку сольвентом, нажав клавишу на корпусе (сверху) мешалки. Заполните так, чтобы электроды были погружены в раствор. Включите мешалку (dv/dt) переключателем (красного цвета) в положение 1, установите скорость вращения мешалки в положение 3.

4. Нажмите кнопку «START» на передней панели титратора, зажжется лампочка зеленого цвета «COND» (мигает), на дисплее появится надпись «Titer — wait». При этом идет процесс титрования воды, содержащейся в сольвенте. После завершения процесса титрования воды в сольвенте зеленая лампочка горит постоянно, не мигая, на дисплее появится надпись «Titer — conditioning».

5. Нажмите кнопку «START», зеленая лампочка «COND» погаснет, на дисплее появится надпись «KFR-volume-0,000 ml simpl 1 size».

6. Взвесьте на аналитических весах шприц с дистиллированной водой (с точностью 0,0001 г.). Введите пробу воды (в количестве 2...3 капли) с помощью шприца в ячейку с сольвентом. Взвесьте шприц с оставшейся водой еще раз. Рассчитайте массу воды, введенной в ячейку, и наберите ее на дисплее титратора. После этого надо нажать кнопку «Enter». При этом начинается процесс титрования. На дисплее показывается объем сольвента «KFR-volume», пошедший на титрование (см³). По окончании процесса титрования происходит автоматический расчет титра воды, который затем высвечивается на дисплее титратора (например 5,000 мг/см³)*.

7. По окончании следует нажать кнопку «STOP».

* При определении титра воды можно проводить титрование несколько раз, не меняя сольвента (начинать с п. 4). Если на табло высветится надпись «Change solv» — нажать кнопку «CLEAR» и повторить операции с п. 4.

8. Для ввода расчетного титра (из 10 параллельных определений) в память машины: нажать кнопку «MODE», на табло появится надпись «KFT», затем нажать «ENTER» — на табло «KFT-conditioning», затем «TITER» и 3 раза «ENTER». На табло высветится надпись «TITER» и ввести расчетный титр. Для выхода из программы — два раза нажать «QUIT».

Изучение влияния некоторых факторов на определение влажности в пищевых продуктах. Целью настоящей работы является изучение влияния температуры, времени экстракции влаги на определение влажности муки.

Таблица 9.1
Варианты титрования
по методу К. Фишера

№ п/п	Температура, °С	Время экстракции, с
1	25	600
2	25	1200
3	50	600
4	50	1200
5	35	600
6	35	1200

Перед проведением титрования следует установить необходимое время титрования (см. табл. 9.1). Для этого надо нажать кнопку «PARAMETERS» при этом на дисплее появится надпись «Titer parameters», после чего нажать кнопку «PARAMETERS» до появления на дисплее надписи «Extr time» и установить необходимое время экстракции. Из программы выйти нажатием кнопки «QUIT».

Для поддержания температуры на необходимом уровне необходимо использовать ячейку, снабженную водяной рубашкой.

Порядок работы на приборе и проведение анализа:

1. Нажать кнопку «START», на передней панели титратора загорится лампочка зеленого цвета «COND» (мигает), на дисплее надпись «Titer-wait», при этом идет процесс титрования воды, содержащийся в сольвенте. После завершения титрования зеленая лампочка «COND» горит постоянно, не мигая, на дисплее надпись «Titr-conditioning».

2. Нажать кнопку «START», зеленая лампочка «COND» погаснет, на дисплее «Smpl. 1 size».

3. Взвесить на аналитических весах в специальном патроне пробу муки (около 0,3000 г), ввести пробу в ячейку, после чего патрон взвесить еще раз. Рассчитать массу навески и набрать ее на дисплее. Нажать кнопку «ENTER». При этом начинается процесс титрования. На дисплее показывается объем «KFR-volume», пошедший на титрование (V , см³). По окончании титрования на дисплее высвечивается конечный результат титрования.

4. По окончании титрования нажать кнопку «STOP».

5. В процессе титрования через каждые 60 с фиксировать величину объема титранта, пошедшего на титрование.

Полученные данные внести в табл. 9.2.

Таблица 9.2

Влияние температуры, времени экстракции влаги на определение влажности муки
($\tau_{\text{экс}}$ — время экстракции, с)

Время титрования, с	25 °С				35 °С				50 °С			
	$\tau_{\text{экс}} = 600;$ $m_{\text{обр.}} \cdot \Gamma = \underline{\hspace{2cm}}$		$\tau_{\text{экс}} = 1200;$ $m_{\text{обр.}} \cdot \Gamma = \underline{\hspace{2cm}}$		$\tau_{\text{экс}} = 600;$ $m_{\text{обр.}} \cdot \Gamma = \underline{\hspace{2cm}}$		$\tau_{\text{экс}} = 1200;$ $m_{\text{обр.}} \cdot \Gamma = \underline{\hspace{2cm}}$		$\tau_{\text{экс}} = 600;$ $m_{\text{обр.}} \cdot \Gamma = \underline{\hspace{2cm}}$		$\tau_{\text{экс}} = 1200;$ $m_{\text{обр.}} \cdot \Gamma = \underline{\hspace{2cm}}$	
	$V, \text{ см}^3$	$W, \%$	$V, \text{ см}^3$	$W, \%$	$V, \text{ см}^3$	$W, \%$	$V, \text{ см}^3$	$W, \%$	$V, \text{ см}^3$	$W, \%$	$V, \text{ см}^3$	$W, \%$
60												
120												
180												
240												
300												
...												
1200												

По результатам определений рассчитать влажность продукта (в %) в каждой точке титрования по формуле:

$$W = \frac{V_T T_{\text{H}_2\text{O}}}{1000 \cdot m_{\text{обр}}} \cdot 100,$$

где V_T — объем титранта, пошедший на титрование образца в данный момент времени, см^3 ; $T_{\text{H}_2\text{O}}$ — титр воды, $\text{мг}/\text{см}^3$; $m_{\text{обр}}$ — масса образца, г.

Построить график зависимости $W = f(t)$ при разных температурах.

Лабораторная работа 9.2.2

Определение массовой доли влаги методом высушивания до постоянной массы

Метод основан на высушивании образца в сушильном шкафу при температуре 100...105 °С до постоянной массы.

Аппаратура, материалы:

- ♦ Бюксы металлические.

- ♦ Шкаф сушильный СЭМ.
- ♦ Весы аналитические.

Метод проведения анализа. Для анализа необходим бюкс, высушенный в сушильном шкафу при температуре 100...105 °С до постоянной массы. В предварительно взвешенный бюкс помещают навеску измельченного вещества с массой 3...5 г, взятую с погрешностью — 0,0002 г, и высушивают в сушильном шкафу при 100...105 °С до тех пор, пока не установится постоянная масса остатка, то есть пока два последующих взвешивания навески не покажут практически одинаковую массу. Разница в массе между двумя последующими взвешиваниями должна быть не более 0,0002 г. Первое взвешивание навески обычно проводят спустя 3...4 часа от начала сушки, а каждое последующее через 1...2 часа, в зависимости от свойств высушиваемого продукта.

Сушат продукт в 2-х повторностях. Расхождение между двумя повторными определениями по этому методу должно лежать в пределах 1%. Среднюю величину из двух повторных определений принимают за массовую доли влаги исследуемого объекта.

При взвешивании бюкса с навеской крышка должна быть закрыта, а объект высушивают при открытой крышке. Полученные данные вносят в табл. 9.3.

Таблица 9.3

Определение влажности путем высушивания до постоянной массы

№ опыта	№ образца	Время взвешивания, ч	Масса образца, г.			
			1-е взвешивание	2-е взвешивание	...	n-е взвешивание
1	1					
	2					
2	1					
	2					
3	1					
	2					

Массовую долю влаги (в %) рассчитывают по формуле:

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

где m — масса образца до высушивания, m_1 — масса образца после высушивания.

Лабораторная работа 9.2.3

Применение ИК-сушки для определения влажности пищевых продуктов

Особенностью применения ИК-излучения в пищевой промышленности для процессов, связанных с прогревом материалов (в частности сушки), является проникновение в них на некоторую глубину лучистого потока. Глубина проникновения ИК-лучей в прогреваемый материал зависит от его свойств, структуры и характера поверхности, степени измельчения материала, а также от длины волны излучения, температуры и длительности (воздействия) прогрева. Особенностью передачи тепла материалам, нагреваемым ИК-излучением, по сравнению с конвективной передачей, является возможность создания во много раз большей плотности потока тепла, что позволяет достичь значительно больших скоростей прогрева материала.

Цель работы: изучение влияния некоторых факторов (температуры, времени высушивания) на определение влажности методом ИК-сушки.

Аппаратура: ИК анализатор влажности «Sartorius» MA-30.

Подготовка пробы для анализа:

- а) зерно, хлеб, кофе и т. п. продукты необходимо измельчить на лабораторной мельнице;
- б) мука и другие порошкообразные продукты предварительной подготовки не требуют.

Порядок работы на приборе и методика проведения анализа:

1. Включить прибор в сеть.
2. Включить кнопку «ON/OFF».
3. Нажатием кнопки «MODE» выбрать 0...100 %, в этом случае на дисплее прибора будет высвечиваться конечный результат анализа в %.
4. Для выбора температуры высушивания нажать клавишу «SP». На дисплее появится термометр и весы. Двойным нажатием кнопок «P₁» и «P₂» можно изменить температуру. Так, нажатием (несколько раз) кнопки «P₁» можно увеличить температуру высушивания, нажатием «P₂» — уменьшить.
5. Нажатием кнопок «SP₁», «P₁» и «P₂» можно изменить время высушивания. С помощью кнопки P₁ можно увеличить время высушивания, с помощью P₂ — уменьшить. Если установить время высушивания t_{\min} , то высушивание анализируемого продукта будет происходить до постоянной массы.

6. После выбора каждого параметра необходимо его ввести в память прибора, для этого нажать кнопку «ENTER».

7. Для выбора времени, через которое на дисплее прибора будет появляться результат, необходимо нажать CP и затем «ENTER».

8. Перед проведением высушивания необходимо взвесить пробу. Для этого надо нажать кнопку «CP», затем «ENTER» и таким образом занулить весы.

9. Взвесить пустую чашку и вновь занулить весы. На чашку весов поместить образец (масса образца должна быть 2,5...3 г). Образец хорошо разравнивать на поверхности чашки.

10. Закрыть крышку прибора, с этого момента начнется процесс высушивания, по завершению которого на дисплее высветится результат анализа.

11. По окончании работы нажать «CP».

Полученные данные — влажность при различных режимах ИК-сушки — вносят в таблицу (табл. 9.4).

По полученным данным делают вывод о влиянии изучаемых факторов на определение влажности методом ИК-сушки.

Таблица 9.4

Определения влажности ИК-сушки

№ п/п	Время сушки, мин	Влажность при различных температурах, °С		
		t_1	t_2	t_3
1				
2				
3				
...				

Лабораторная работа 9.2.4

Определение активности воды в кондитерских изделиях

Изменение влажности пищевого продукта при хранении определяется его гигроскопичностью, консистенцией и зависит от направленности и скорости массопереноса между продуктом и окружающей средой.

В основе метода определения активности воды (a_w) лежит определение равновесной относительной влажности (РОВ), которая связана с активностью воды следующим уравнением: $РОВ = 100 \cdot a_w$.

Сущность метода заключается в сравнении РОВ, а следовательно, и активности воды a_w стандартных насыщенных растворов индивидуальных солей при постоянной определенной температуре со значениями равновесного содержания влаги в пищевых продуктах при той же температуре, полученными с помощью весового метода.

Исходное содержание влаги в образце пищевого продукта определяют стандартным методом высушивания до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

В качестве стандартных используют насыщенные растворы некоторых солей, значения РОВ и растворимость в воде которых при температуре 25 °С представлены в табл. 9.5.

Таблица 9.5
Значения РОВ и растворимость в воде некоторых солей 25 °С

Наименование соли	РОВ, %	a_w	Растворимость, г/100 г раствора
Бромид лития (LiBr)	6,6	0,06	177,0
Хлорид лития (LiCl)	11,3	0,11	45,3
Ацетат калия (CH ₃ COOK)	23,0	0,23	25,3
Хлорид магния (MgCl ₂)	33,0	0,33	35,3
Карбонат калия (K ₂ CO ₃)	43,0	0,43	52,5
Бромид натрия (NaBr)	58,0	0,58	47,6
Хлорид меди (CuCl ₂)	68,0	0,68	50,1
Йодид калия (KI)	70,0	0,70	59,1
Хлорид натрия (NaCl)	75,5	0,75	26,4
Сульфат аммония (NH ₄) ₂ SO ₄	80,5	0,80	43,0
Хлорид калия (KCl)	85,0	0,85	25,5
Бензоат натрия (C ₆ H ₅ COONa)	88,0	0,88	66,0
Нитрат калия (KNO ₃)	94,0	0,94	24,1
Сульфат калия (K ₂ SO ₄)	97,5	0,97	10,0

Как следует из табл. 9.5 представленный ряд насыщенных растворов и суспензий неорганических солей охватывает диапазон значений a_w от 0,6 до 0,97. Безводная P₂O₅ и чистая вода могут быть использованы как первичные стандарты, a_w которых равна соответственно 0,0 и 1,0.

Цель работы: определить активность воды в образцах кондитерских изделий методом определения РОВ и методом определения точки росы на охлажденном зеркале с помощью прибора «Аквалаб».

Реактивы и материалы:

- ♦ Насыщенные растворы солей.
- ♦ Образцы кондитерских изделий.

Приготовление насыщенных растворов солей

Взвешивают на технических весах такое количество соли, которое на 20...30 % превышает ее растворимость (табл. 9.5), и добавляют необходимое количество дистиллированной воды. Полученную смесь нагревают при перемешивании до 100 °С и охлаждают. При охлаждении из образовавшегося перенасыщенного раствора выпадают в осадок кристаллы соли. Таким образом получают насыщенный раствор соли над осадком, который остается на дне.

Методика проведения анализа. 1. Определение активности воды в образцах кондитерских изделий методом определения РОВ. Образцы кондитерских изделий массой 8...9 г каждый устанавливают в чашки Петри (в трех повторностях) в верхнюю часть эксикатора на фарфоровую пластину, в то время как на дно эксикатора помещают насыщенные растворы подходящих по ожидаемой РОВ солей. Объем каждого раствора соли должен составлять не менее 1 дм³.

Образцы взвешивают через 48 часов до тех пор, пока не будет достигнуто равновесие в содержании влаги над образцом и насыщенным раствором соответствующей соли в эксикаторе при определенной температуре. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,1 мг.

По данным исходной влажности рассчитывают массу сухих веществ в навеске исследуемого образца:

$$m_0 = m_1 \cdot \frac{100 - W_0}{100},$$

где m_1 — масса навески образца, г; W_0 — исходная массовая доля влаги, %.

Затем рассчитывают равновесную влажность образца (%):

$$РВ = 100 \cdot \frac{m_2 - m_0}{m_2},$$

где m_2 — масса образца после экспозиции в эксикаторе, г; m_0 — масса сухих веществ в исследуемой навеске, г.

Равновесную относительную влажность (РОВ), а соответственно и a_w исследуемого образца определяют графически: на оси абсцисс откладывают относительную влажность насыщенных растворов солей, а по оси ординат — равновесную влажность образца.

2. Определение активности воды в образцах кондитерских изделий методом определения точ-

ки росы на охлажденном зеркале с помощью прибора «Аквалаб». Определение активности воды с помощью прибора «Аквалаб» проводят как описано в п. 9.1.9, с. 231.

Полученные данные сводят в общую таблицу и сравнивают результаты определений активности воды в кондитерских изделиях, проведенные разными методами.

Контрольные вопросы

1. Дайте определения понятиям свободная и связанная влага?
2. Какое влияние оказывает влажность пищевого продукта на его сохранность?
3. Какие методы определения влаги вы знаете?
4. В чем состоит сущность метода определения влаги по методу К. Фишера? Его недостатки и преимущества.
5. На чем основан метод определения влаги с помощью ИК-излучения?
6. Дайте определение понятия «активность воды», какие методы определения вам известны?
7. На чем основан термогравиметрический метод определения влажности пищевых продуктов?
8. В чем заключается принцип работы прибора для определения активности воды «Аквалаб»?

**БЕЗОПАСНОСТЬ ПИЩЕВЫХ
ПРОДУКТОВ**

Чужеродные химические вещества (контаминанты) могут попадать в пищу из окружающей среды или в ходе технологического процесса, например при контакте с оборудованием или из упаковочного материала при транспортировке и хранении. Таким образом, в организм человека с пищевыми продуктами попадает огромное количество веществ антропогенного и биологического происхождения, опасных для здоровья человека.

**10.1. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПОКАЗАТЕЛЕЙ
БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

Методы контроля качества и безопасности широко представлены в стандартах, научно-технической и учебной литературе. Однако эти методы, основанные на разных принципах, могут давать заметные расхождения при исследовании одних и тех же объектов. Поэтому возникла необходимость отбора наиболее надежных и доступных для большинства лабораторий методик определения безопасности пищевых продуктов.

10.1.1. Методы определения микотоксинов

Современные методы обнаружения и определения содержания микотоксинов в пищевых продуктах и кормах включают скрининг-методы, количественные аналитические и биологические методы.

Скрининг-методы отличаются быстротой и удобны для проведения серийных анализов, позволяют быстро и надежно разделять загрязненные и незагрязненные образцы. К ним относятся такие широко распространенные методы, как миниколоночный метод определения афлатоксинов, охратоксина А и зеараленона; методы тонкослойной хроматографии (ТСХ-методы) для одновременного определения до

30 различных микотоксинов, флуоресцентный метод определения зерна, загрязненного афлатоксинами и некоторые другие.

Количественные аналитические методы определения микотоксинов представлены химическими, радиоиммунологическими и иммуноферментными методами. Химические методы являются в настоящее время наиболее распространенными и состоят из двух стадий: стадия выделения и стадия количественного определения микотоксинов. Стадия выделения включает экстракцию (отделение микотоксина от субстрата) и очистку (отделение микотоксина от соединений с близкими физико-химическими характеристиками). Окончательное разделение микотоксинов проводится с помощью хроматографических методов: газовая (ГХ) и газожидкостная хроматография (ГЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), а также методом масс-спектрометрии. Количественную оценку содержания микотоксинов проводят путем сравнения интенсивности флуоресценции при ТСХ в ультрафиолетовой области спектра со стандартами. Для подтверждения достоверности полученных результатов применяют различные тесты, основанные на получении производных микотоксинов с иными хроматографическими, колориметрическими или флюорометрическими характеристиками.

Высокочувствительные и высокоспецифичные радиоиммунохимические и иммуноферментные методы обнаружения, идентификации и количественного определения микотоксинов находят все более широкое применение и пользуются повышенным вниманием со стороны исследователей. Эти методы основаны на получении антисывороток к конъюгатам микотоксинов с бычьим сывороточным альбумином. Основным преимуществом этих методов является их исключительная чувствительность.

Биологические методы обычно не отличаются высокой специфичностью и чувствительностью и применяются главным образом в тех случаях, когда отсутствуют химические методы выявления микотоксинов или в дополнение к ним в качестве подтверждающих тестов. В качестве тест-объектов используют различные микроорганизмы, куриные эмбрионы, различные лабораторные животные, культуры клеток и тканей.

10.1.2. Методы определения нитратов, нитритов, N-нитрозоаминов

К ним относятся фотометрический и ионометрический методы анализа нитратов и нитритов, а также флуориметрический и хемилюминесцентный методы определения N-нитрозоаминов.

Ниже приводится метод определения нитратов с помощью иноселективной потенциометрии, который может быть использован при постановке лабораторных работ (п. 10.2, с. 250).

Ионометрия — метод анализа, связанный с применением иноселективных мембранных электродов, функционирующих по механизму переноса ионов, то есть обладающих ионной проводимостью. Мембрана проницаема для одного или нескольких видов ионов, и это обеспечивает достаточно высокую селективность электрода. В настоящее время насчитывается несколько десятков типов иноселективных электродов: стеклянные электроды, электроды на основе твердых ионитовых мембран (гомогенных и гетерогенных), электроды с жидкими ионитовыми мембранами, газовые электроды, электроды для измерения активности (концентрации) биологически активных веществ.

Иноселективным электродам свойственна избирательность, и в этом случае уравнение Нернста имеет вид (уравнение Никольского):

$$E = \text{const} + \frac{0,059}{n} \cdot \lg \left(a_M + K_{M,x} \cdot a_x^{\frac{n}{z_x}} \right),$$

где a_M — активность определяемого иона; n — заряд определяемого иона; a_x — активность мешающего иона; $K_{M,x}$ — коэффициент селективности электрода по отношению к определяемому иону M на фоне мешающего иона X , он характеризует вклад мешающего иона в значение потенциала электрода.

Если $K_{M,x}$ достаточно мал, то $E = \text{const} + 0,059 \lg a_M$.

Построение градуировочного графика. Готовят стандартные растворы NaNO_3 с концентрацией ионов NO_3^- , составляющей: $5 \cdot 10^{-2}$; $1 \cdot 10^{-2}$; $5 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-4}$ М (табл. 10.1) в колбах вместимостью 200 см^3 . Исходным раствором являются $0,1000 \text{ М NaNO}_3$, приготовленный по точной навеске в мерной колбе вместимостью 500 см^3 .

Таблица 10.1

Потенциалы индикаторного электрода в растворах NaNO_3 с различной концентрацией ионов NO_3^-

Электродный потенциал, мВ	$C(\text{NO}_3^-)$, моль/дм ³						
	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	10^{-1}
	$\lg C(\text{NO}_3^-)$						
	4,00	3,30	3,00	2,30	2,00	1,30	1,00
E_1							
E_2							
E_3							
$E_{\text{ср}}$							

В каждом растворе проводят измерение потенциала индикаторного электрода на рН-метре — милливольтметре рН-121 или другой марки. Полученные данные заносят в табл. 10.1 и рассчитывают среднее значение E (из трех повторных измерений) для каждой концентрации.

Градуировочный график строят в координатах « $E - f(-\lg C)$ ».

10.1.3. Методы определения насыщенных и ароматических углеводов

Эти методы включают хроматографические и оптические методы исследования. Они предусматривают стадию выделения, идентификации и количественного определения углеводов с применением газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для определения полициклических ароматических углеводов (ПАУ) рекомендован метод низкотемпературной спектрофлуориметрии.

10.1.4. Методы определения тяжелых металлов

Для определения тяжелых металлов применяют метод переменного тока полярнографии. Этот метод также может быть использован при постановке лабораторных работ (п. 10.2, с. 250).

Метод основан на сухой минерализации проб пищевых продуктов или напитков и дальнейшем определении исследуемых ионов в растворе минерализата полярнографически в режиме переменного тока.

Полярнография — электрохимический метод анализа, основанный на изучении поляризационных кривых.

Полярнография постоянного тока (классическая)

Полярнографическая установка (рис. 10.1) состоит из источника постоянного тока 1, делителя напряжения 2, рабочего (капельного ртутного) электрода и вспомогательного (донная ртуть) электрода. Для измерения силы тока в систему подключают микроамперметр 3. Электроды помещены вместе с исследуемым раствором в электролизере 5. Ртутно-капельный электрод 4 является катодом, донная ртуть 6 — анодом.

Наложенное на электрохимическую ячейку напряжение вызывает поляризацию анода и катода:

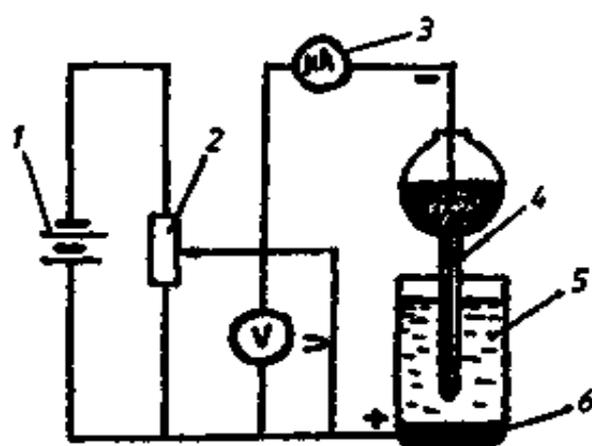


Рис. 10.1. Принципиальная схема полярграфической установки

Если уменьшить сопротивление раствора, добавив сильный электролит (фон), то величина iR (падение потенциала в растворе) будет настолько малой, что ею можно пренебречь. Тогда потенциал капающего поляризующегося катода с небольшой поверхностью будет равен: $E = -\varphi_K$

Полярграфические данные получают путем измерения тока, проходящего через электрохимическую ячейку, как функции потенциала, налагаемого на электроды. Графическую зависимость силы тока от потенциала называют полярграфической волной (рис. 10.2).

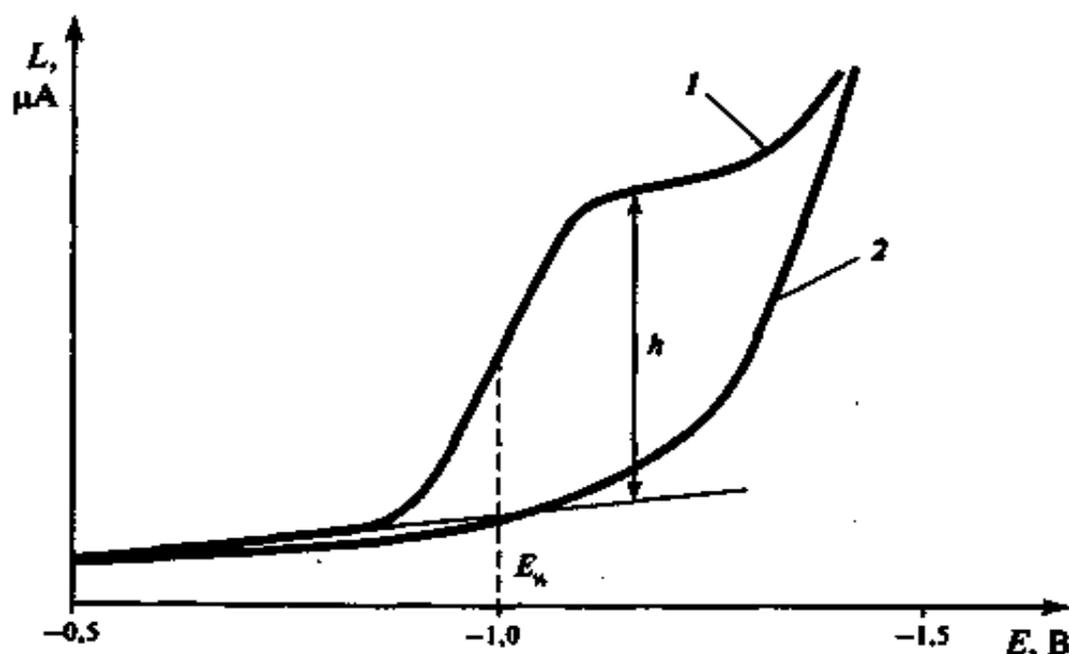


Рис. 10.2. Полярграмма $1 \cdot 10^{-3}$ раствора хлорида цинка: а — в 1 М растворе хлорида калия; б — в 1 М растворе хлорида калия (2)

В начале электролиза при небольших значениях наложенной ЭДС сила тока будет почти постоянной и лишь очень медленно возрастать.

Это так называемый остаточный ток, который остается во все время электролиза. Как только будет достигнут потенциал восстановления ионов (например, для определяемых ионов цинка он равен $-1,0\text{В}$), начинается разряд их на капле ртути:



На катоде образуется разбавленная амальгама цинка Zn(Hg) , которая разлагается на ее составляющие, как только падающая капля соприкоснется с анодом:



При потенциале восстановления ионов цинка сила тока резко возрастает (кривая I на рис. 10.2 круто устремляется вверх), но после достижения определенной величины, несмотря на увеличение наложенной ЭДС, она остается почти постоянной. Этот ток называется предельным диффузионным, его величина пропорциональна концентрации определяемого вещества.

При снятии полярограмм к исследуемому раствору добавляют какой-либо индифферентный электролит с катионами, восстанавливающимися гораздо труднее анализируемого катиона, например KCl , KNO_3 , HCl , NH_4Cl при концентрации в $100\dots 1000$ раз превышающей концентрацию определяемого вещества. Такой электролит называют фоном. Его создают в исследуемом растворе для увеличения электропроводности и для экранирования электрического поля катода. Поэтому катионы определяемого вещества не притягиваются электрическим полем катода, а двигаются к нему только за счет диффузии.

Важнейшими характеристиками полярограммы являются потенциал полуволны $E_{1/2}$ и высота полярографической волны h (предельный диффузионный ток). Потенциал полуволны используют в качественном полярографическом анализе. Потенциалы полуволны различных веществ, расположенные в порядке возрастания их отрицательного значения, составляют, так называемый, полярографический спектр (таблицы значений $E_{1/2}$).

Поскольку потенциал полуволны существенно зависит от состава раствора (среды), в полярографических таблицах всегда указывается фон. Если в исследуемом растворе содержатся ионы нескольких видов, то восстановление каждого иона на ртутной капле дает свою волну (рис. 10.3), каждая из которых качественно и количественно определяет соответствующее вещество.

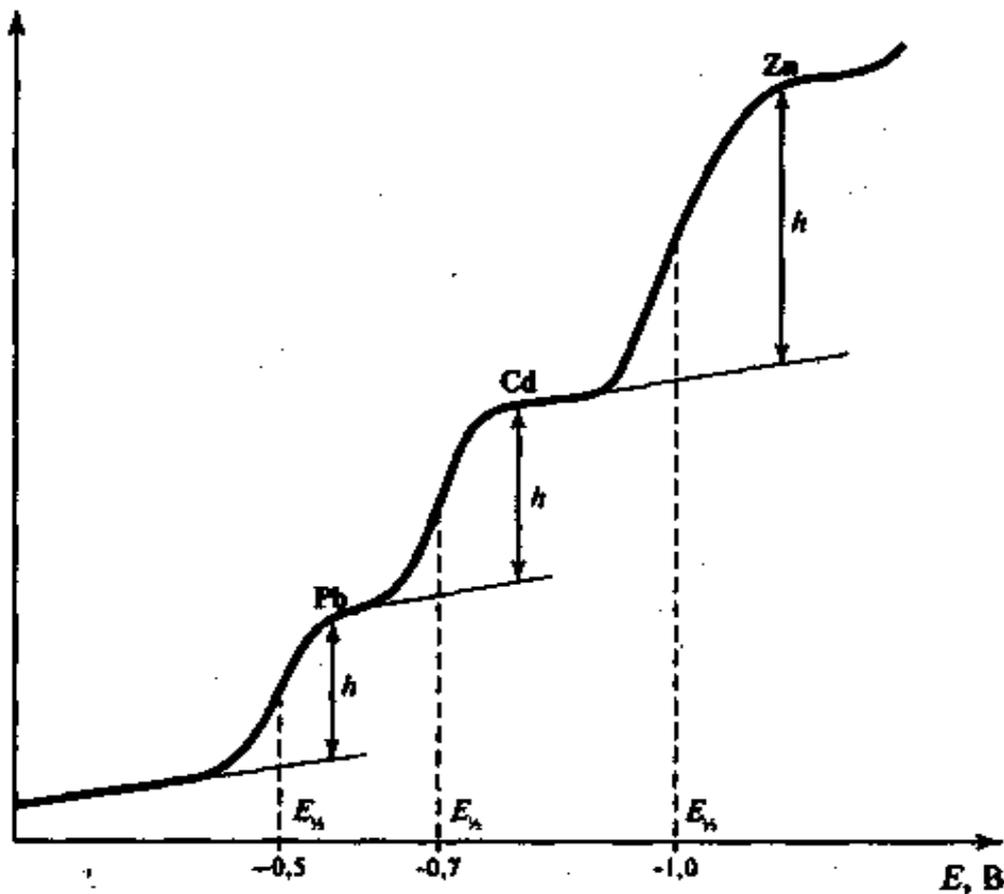


Рис. 10.3. Полярограмма раствора, содержащего ионы свинца, кадмия и цинка. Фон — 1 М раствор хлорида калия

Полярография переменного тока

Чувствительность метода полярографии постоянного тока ограничивается наличием ряда помех, главной из которых является емкостный ток. Метод переменноточковой полярографии дает более высокую чувствительность по сравнению с постоянноточковой.

В переменноточковой полярографии к электрохимической ячейке, кроме медленно изменяющегося поляризующего напряжения, подводится еще и переменное напряжение небольшой амплитуды. Это позволяет существенно уменьшить влияние емкостных токов путем временной селекции токов ячейки в конце каждого полупериода импульсного напряжения.

График зависимости силы переменного тока, проходящего через ячейку, от величины потенциала рабочего электрода называется переменноточковой полярограммой. При наличии в растворе восстанавливающегося (окисляющегося) вещества на полярограмме получается явно выраженный максимум (пик), высота которого пропорциональна концентрации исследуемого вещества, а положение максимума на

оси поляризующих напряжений характеризует природу анализируемого вещества (рис. 10.4). Положение пика на переменноточковой полярограмме для обратимых процессов совпадает с потенциалом полу-волны постоянноточковой полярограммы.

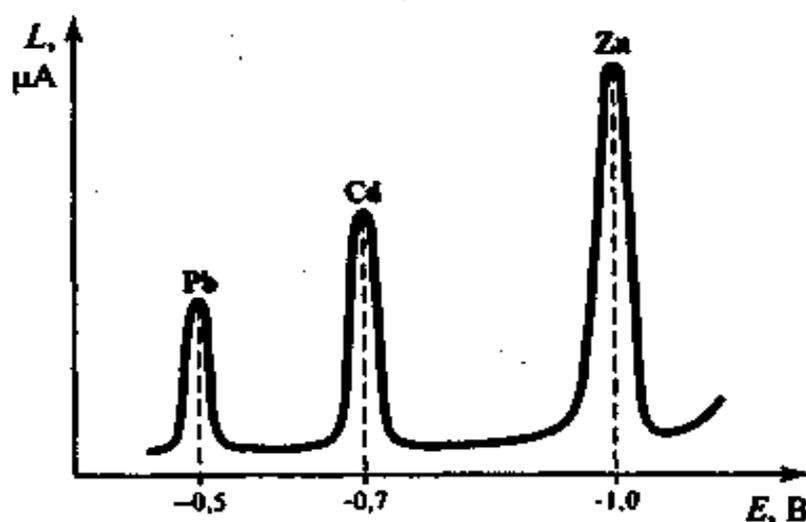


Рис. 10.4. Переменноточковая полярограмма раствора, содержащего ионы свинца, кадмия и цинка. Фон — 1 М раствор хлорида калия

Если раствор содержит несколько компонентов, то на полярограмме будет соответственно несколько пиков, каждый из которых качественно и количественно определяет свой компонент (рис. 10.4).

10.1.5. Количественный полярографический анализ

В количественном полярографическом анализе используют один из четырех способов: метод градуировочного графика; метод сравнения; метод добавок; расчетный метод.

При работе по методу градуировочного графика снимают полярограммы ряда стандартных растворов, измеряют высоты пиков (h) и строят градуировочный график в координатах: высота пика — концентрация. Используя данный график, по высоте пика (h_x), определяют искомую концентрацию (C_x).

При работе по методу сравнения измеряют высоты пиков на полярограммах двух — трех стандартных растворов и определяют средний коэффициент пропорциональности:

$$h_1 = K_1 \cdot C_1; h_2 = K_2 \cdot C_2,$$

отсюда:

$$K_1 = \frac{h_1}{C_1}; K_2 = \frac{h_2}{C_2}; K = \frac{K_1 + K_2}{2}.$$

Далее, измерив высоту пика исследуемого раствора и используя вычисленный коэффициент пропорциональности, определяют C_x :

$$C_x = \frac{h_x}{K}.$$

В методе добавок измеряют высоту пика для исследуемого раствора h_1 , затем к нему добавляют строго определенное количество стандартного раствора C_0 и снова определяют высоту пика h_2 . Концентрацию определяемого элемента C_x находят, решая систему уравнений:

$$h_1 = K \cdot C;$$

$$h_2 = K(C_x - C_0),$$

где $(C_x - C_0)$ — концентрация после добавления стандартного раствора; K — коэффициент пропорциональности.

Если известны коэффициенты диффузии D и характеристика капилляра, из которого вытекает ртуть ($m^{3/4} \cdot t^{1/4}$), то концентрацию C_x определяемого элемента можно вычислить расчетным методом, используя уравнение Ильковича:

$$i_\eta = 607 \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot m^{3/4} \cdot t^{1/4} \cdot C_x,$$

где i_η — диффузионный ток, мкА; n — число электронов, участвующих в электрохимической реакции; m — масса ртути, вытекающая из капилляра за 1 с, мг; t — время образования одной капли, с; C_x — концентрация, ммоль/дм³.

10.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 10.2.1

Определение тяжелых металлов в пищевом сырье и пищевых продуктах методом переменного тока полярографии

Токсичные элементы (в частности, некоторые тяжелые металлы) составляют обширную и весьма опасную в токсикологическом отно-

шении группу веществ. Обычно рассматривают 14 элементов: Hg, Pb, Cd, As, Sb, Sn, Zn, Al, Be, Fe, Cu, Ba, Cr, Ti.

Разумеется, не все перечисленные элементы являются ядовитыми, некоторые из них необходимы для нормальной жизнедеятельности человека и животных. При повышении оптимальной физиологической концентрации элемента в организме может наступить интоксикация, а дефицит многих элементов в пище и воде может привести к достаточно тяжелым и трудно распознаваемым явлениям недостаточности.

Источниками загрязнения сырья и пищевых продуктов могут являться выбросы промышленных предприятий (особенно угольной, металлургической и химической промышленности), выбросы автотранспорта, применение в консервном производстве некачественных внутренних покрытий, контакт с оборудованием при производстве пищевых продуктов.

Для большинства продуктов установлены предельно-допустимые концентрации (ПДК) токсичных элементов, к продуктам детского и диетического питания предъявляются более жесткие требования.

Цель работы: С помощью метода переменноточковой полярографии определить содержание тяжелых металлов в различных видах пищевых продуктов:

Аппаратура, реактивы и материалы:

- ♦ Полярограф ПУ-1.
- ♦ Азотная кислота концентрированная.
- ♦ Азотная кислота, раствор 1 : 1.
- ♦ Хлороводородная кислота, 0,1 М раствор.
- ♦ Основной стандартный раствор меди, $c(\text{Cu}) = 1 \text{ мг/см}^3$.
- ♦ Основной стандартный раствор свинца, $c(\text{Pb}) = 1 \text{ мг/см}^3$.
- ♦ Основной стандартный раствор кадмия, $c(\text{Cd}) = 1 \text{ мг/см}^3$.
- ♦ Основной стандартный раствор цинка, $c(\text{Zn}) = 1 \text{ мг/см}^3$.
- ♦ Азот газообразный или любой другой инертный газ, свободный от кислорода.

Методика проведения анализа. Подготовка проб пищевых продуктов для полярографирования. Примерные величины навесок пищевых продуктов приведены ниже:

Наименование сырья, пищевых продуктов	Масса навески, г
Плоды, овощи, продукты переработки плодов и овощей	15...20
Зерно и продукты его переработки	10...15
Хлеб и хлебобулочные изделия	10...15
Кондитерские изделия	10...15

А. Зерно, мука, крупа, хлеб, кондитерские изделия.

Пробы продуктов берут в трех параллельных повторностях. Навески помещают в тигли, ставят на электрическую плитку и обугливают их до исчезновения дыма. Затем тигли помещают в муфельную печь, температуру в которой постепенно увеличивают до 450°C .

После получения бурой золы ее смачивают разбавленной азотной кислотой (1 : 1), упаривают на электроплитке и далее снова озоляют в муфельной печи до получения белой золы (при необходимости обработку азотной кислотой повторяют). К полученной белой золе добавляют 2 см^3 концентрированной азотной кислоты и упаривают досуха.

Б. Фрукты, овощи, продукты переработки плодов и овощей.

Пробы высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°C . Затем содержимое тиглей смачивают азотной кислотой так, чтобы вся поверхность была покрыта кислотой, и нагревают на водяной бане до прекращения выделения паров. Обработку азотной кислотой повторяют еще два раза.

Обработанную пробу обугливают на электроплитке, затем помещают в муфельную печь и далее продолжают минерализацию по п. А.

В. Напитки, вино, пиво.

Газированные напитки, шипучие вина, пиво перед минерализацией освобождают от углекислого газа. Для этого их достаточно нагреть до температуры $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$.

Затем пипеткой или мерным цилиндром отмеривают пробы, помещают в тигли. Пробы ставят на электроплитку со слабым нагревом и упаривают досуха (не допуская разбрызгивания). Затем пробы обугливают на электроплитке до исчезновения дыма и ставят в муфельную печь. Далее продолжают минерализацию по п. А.

Золу, полученную, как описано в пп. А, Б и В, растворяют в тигле при нагревании в 2 см^3 $0,1\text{ М НСl}$, охлаждают и фильтруют в мерный цилиндр вместимостью 10 см^3 через обеззоленный фильтр, предварительно промытый фоновым электролитом ($0,1\text{ М НСl}$). Смывают тигель малыми порциями (2 см^3) фонового электролита и доводят объем раствора до 10 см^3 .

Проведение полярографирования. Измерение проводят на полярографе в режиме переменного тока с ртутно-капельным электродом в электролизере вместимостью 20 см^3 .

В электролизер вносят испытуемый раствор (9 см^3), затем из раствора удаляют кислород барботированием азота в течение 10 мин.

Полярограмму записывают при напряжении для: меди — от 0 до 0,5 В; свинца — от 0,4 до 0,7 В; кадмия — от 0,6 до 0,9 В; цинка — от 0,9 до 1,2 В.

После проведения полярографирования исследуемой пробы в электролизер вносят точно измеренный объем стандартного раствора (добавки), содержащего определяемые металлы в известных концентрациях. Снова удаляют кислород и полярографируют при тех же условиях.

Стандартный раствор (добавку) готовят из основных стандартных растворов металлов путем разбавления их. Концентрацию металлов в добавке подбирают так, чтобы высота пика на второй полярограмме примерно удвоилась по сравнению с первой.

Обработка результатов. Массовую долю тяжелых металлов (в мг/кг) вычисляют по высоте пиков, измеренных на полярограммах с помощью линейки с точностью до 1 мм, по формуле:

$$C_x = \frac{h_1 V_d C_d}{h(V_x + V_d) - hV_x} \cdot \frac{V_0}{m}$$

где h_1 — высота пика, полученная при полярографировании исследуемого раствора; h_2 — высота пика, полученная при полярографировании после внесения добавки, мм; V_d — объем внесенной добавки, см³; C_d — концентрация металла в добавке, мкг/см³; V_x — объем исследуемого раствора, взятый для полярографирования, см³; V_0 — общий объем раствора, приготовленный из озоленной навески, см³; m — навеска образца, взятая на озоление, г.

Результаты определений вносят в табл. 10.2.

Таблица 10.2

Содержание тяжелых металлов в пищевом сырье и пищевых продуктах

Образец	№ тигля	Элемент	h_1	h_2	V_0	V_x	V_d	C_d	m	C_x
		Cu								
		Pb								
		Cd								
		Zn								

За результат анализа принимают среднее значение трех параллельных определений. Полученный результат сравнивают со значениями ПДК (прил. 9, с. 299) и делают вывод о соответствии исследуемых продуктов критериям безопасности по тяжелым металлам.

Лабораторная работа 10.2.2

Анализ содержания нитратов в плодоовощной продукции с помощью нитратного ионоселективного электрода

В зависимости от вида плодоовощной продукции, состава клеточного сока плодов и овощей значение ионной силы может изменяться. Для избежания ошибки в анализируемые растворы вводят посторонние индифферентные электролиты для создания достаточно большой и постоянной ионной силы (например, 1 см^3 2 М раствора сульфата аммония на 100 см^3 анализируемого раствора). При обеспечении условий постоянства ионной силы анализируемых растворов и достаточно высокой селективности индикаторного электрода его потенциал зависит только от концентрации анализируемого иона в растворе.

Цель работы: исследовать содержание нитратов в различных образцах плодоовощной продукции.

Реактивы и материалы:

- ♦ Картофель, морковь, яблоки и др.
- ♦ NaNO_3 х. ч.
- ♦ 2М раствор сульфата аммония.
- ♦ Ионоселективный электрод с нитратной функцией ЭМ- NO_3 -01.
- ♦ Хлорсеребряный электрод сравнения ЭВЛ-1М3.

Методика проведения анализа. Образец анализируемого объекта (картофель, морковь, яблоки и др.) предварительно измельчают на терке. 50 см^3 полученной массы помещают в химический стаканчик (строго по метке), добавляют $0,5 \text{ см}^3$ 2 М раствора сульфата аммония и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

В анализируемую суспензию помещают индикаторный ионоселективный электрод вместе с электродом сравнения. Проводят измерение потенциала E_x индикаторного электрода в исследуемой суспензии. Это измерение проводят трижды, помещая каждый раз в стаканчик свежие порции анализируемой суспензии. Вычисляют среднее значение E_x (ср).

По градуировочному графику находят вначале — $\lg C(\text{NO}_3^-)$, а затем величину $C(\text{NO}_3^-)$, выраженную в моль/ дм^3 .

Содержание нитратного азота находят по формуле:

$$m(\text{NO}_3^-) = C(\text{NO}_3^-) \cdot M(\text{NO}_3^-) \cdot W,$$

где $m(\text{NO}_3^-)$ — содержание нитратов в анализируемом образце, мг/100 продукта; $M(\text{NO}_3^-)$ — молярная масса нитрат-иона, г/моль; W — влажность продукта, % (по таблицам химического состава продуктов).

Полученные для разных объектов значения сводят в общую таблицу и сравнивают между собой и со значениями ПДК для каждого вида продукта.

Лабораторная работа 10.2.3

Изучение комплексобразующей способности пектинов

Важная роль пектина в питании человека связана с его способностью связывать ионы тяжелых металлов и выводить их из организма (поскольку пектин не усваивается организмом человека). С ростом загрязнения окружающей среды, в том числе и тяжелыми металлами, возрастает значение в питании человека продуктов, богатых пектином (например, овощей и фруктов).

Одним из тяжелых металлов, которые могут загрязнять пищевые продукты, является медь.

Определение меди можно проводить фотоколориметрическим методом в форме аммиаката меди.

При добавлении избытка аммиака к раствору, содержащему сульфат меди, появляется интенсивное синее окрашивание, обусловленное образованием аммиаката меди с максимумом поглощения при 620 нм.



Цель работы: сравнить способность пектина связывать ионы меди со способностью белков и крахмала.

Реактивы и материалы:

- ♦ 5,0 %-ный раствор аммиака.
- ♦ 0,5 %-ный раствор пектина (яблочный и свекловичный).
- ♦ 0,5 %-ный раствор альбумина.
- ♦ 10 %-ный ТХУ.
- ♦ 1,0 %-ный и 4 %-ный растворы сульфата меди.
- ♦ 1,0 %-ный раствор крахмала.

Методика проведения анализа. К 2 см³ испытуемого раствора, содержащего медь, добавляют 1 см³ 5 %-ного водного раствора аммиака и 2 см³ воды. Содержимое пробирки встряхивают и измеряют на ФЭКе оптическую плотность раствора при выбранном светофильтре. Расчет содержания меди в испытуемом растворе ведут по калибровочной кривой.

Таблица 10.3
Данные для построения графика
изменения оптической
плотности от длины волны

Длина волны, нм	Цвет светофильтра	Оптическая плотность
380		
415		
500		
530		
600		
630		
720		

1. Выбор светофильтра. В пробирке смешивают 2 см^3 1%-ного раствора сульфата меди, 1 мл 5%-ного водного раствора аммиака и 2 см^3 воды. Содержимое пробирки встряхивают и измеряют интенсивность образовавшейся окраски при разных светофильтрах (длинах волн) с целью уточнения максимума поглощения.

Данные заносят в таблицу (табл. 10.3) и строят график изменения оптической плотности от длины волны и выбирают для работы светофильтр, при котором оптическая плотность раствора максимальна.

2. Построение калибровочной кривой.

Из 1,0%-ного исходного раствора сульфата меди готовят растворы с меньшей концентрацией по схеме:

Раствор	Концентрация сульфата меди, мг/см ³
1. Исходный раствор	10
2. 9 см^3 (1) + 1 см^3 воды	9
3. 8 см^3 (1) + 2 см^3 воды	8
4. 7 см^3 (1) + 3 см^3 воды	7
5. 6 см^3 (1) + 4 см^3 воды	6
6. 5 см^3 (1) + 5 см^3 воды	5
7. 4 см^3 (1) + 6 см^3 воды	4
8. 3 см^3 (1) + 7 см^3 воды	3
9. 2 см^3 (1) + 8 см^3 воды	2
10. 1 см^3 (1) + 9 см^3 воды	1

Содержимое пробирок перемешивают и проводят реакцию образования аммиаката меди. Для этого отбирают 2 см^3 испытуемого раствора, добавляют 1 см^3 NH_4OH и 2 см^3 воды. Пробирки встряхивают и измеряют интенсивность образовавшейся окраски на ФЭК при выбранном светофильтре. Полученные данные записывают в таблицу (табл. 10.4) и строят калибровочную кривую. Работа по построению кривой дублируется 2...3 раза. При этом используются те же растворы сульфата меди.

Таблица 10.4

Данные для построения калибровочной кривой

Номер пробирки	CuSO_4 , мг/см ³	Оптическая плотность (A)

3. Способность крахмала связывать ионы меди. В ряд пробирок вносят испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 10.5.

Таблица 10.5

Количество связанной меди в растворах крахмала

№ п/п	CuSO_4 , 4,0%, см ³	Крахмал 1%, см ³	Вода, см ³	Оптическая плотность (A)	Количество связанной меди, мг
1	1	0	4		
2	1	1	3		
3	1	2	2		
4	1	3	1		
5	1	4	0		

Содержимое пробирок встряхивают, при необходимости фильтруют и в фильтрате определяют содержание ионов меди по принятой методике.

4. Способность пектина связывать ионы меди. В ряд пробирок вносят испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 10.6.

Таблица 10.6

Количество связанной меди в растворах пектина

№ п/п	CuSO_4 , 4,0%, см ³	Пектин, см ³	Вода, см ³	Оптическая плотность (A)	Количество связанной меди, мг
1	1	0,0	4,0		
2	1	0,5	3,5		
3	1	1,0	3,0		
4	1	2,0	2,0		
5	1	3,0	1,0		

Содержимое пробирок перемешивают. Образующийся осадок отделяют фильтрованием и в фильтрате определяют содержание ионов меди. Расчет ведут по калибровочной кривой.

5. Способность белка связывать ионы меди. В ряд пробирок вносят испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 10.7.

Таблица 10.7

Количество связанной меди в растворах белка

№ п/п	CuSO ₄ , 4,0%, см ³	Раствор белка, см ³	Вода, см ³	Оптическая плотность (A)	Количество связанной меди, мг
1	1	0,0	4,0		
2	1	0,5	3,5		
3	1	1,0	3,0		
4	1	2,0	2,0		
5	1	3,0	1,0		

Содержимое пробирок перемешивают и фильтруют. В фильтрате определяют содержание ионов меди по интенсивности окраски аммиаката меди. По калибровочной кривой рассчитывают количество меди, связанное с белком.

6. Способность смеси белок + пектин связывать ионы меди. В ряд пробирок вносят растворы в количествах, указанных в табл. 10.8.

Таблица 10.8

Количество связанной меди в растворах белка и пектина

№ п/п	CuSO ₄ , 4,0%, см ³	Пектин, 0,5%, см ³	Белок, 0,5%, см ³	Вода, см ³	Оптическая плотность (A)	Количество связанной меди, мг
1	1	1,0	0,0	3,0		
2	1	1,0	0,5	2,5		
3	1	1,0	1,0	2,0		
4	1	1,0	1,5	1,5		
5	1	1,0	2,0	1,0		
6	1	0,0	1,0	3,0		
7	1	0,5	1,0	2,5		
8	1	1,0	1,0	2,0		
9	1	2,0	1,0	1,0		
10	1	3,0	1,0	0,0		
11	1	0,0	0,0	4,0		

Содержимое пробирок фильтруют и в фильтрате определяют содержание ионов меди по интенсивности окраски аммиаката меди. Расчет ведут по калибровочной кривой. На основании полученных результатов делают вывод о способности разных соединений взаимодействовать с ионами меди. Сравнивают связывающую способность пектина, белка и их смеси. Делают графические построения.

Контрольные вопросы

1. На чем основан полярографический метод анализа? Каковы преимущества метода полярографии?
2. Какие индикаторные электроды применяются в полярографии? Их преимущества и недостатки.
3. На чем основан качественный и количественный полярографический анализ? Какие существуют методы количественных определений?
4. С чем связана способность пектинов связывать ионы тяжелых металлов?
5. На чем основано фотоколориметрическое определение содержания меди?

ОСНОВЫ ПИТАНИЯ И ПИЩЕВАРЕНИЯ

Лабораторная работа 11.1

Методы расчета пищевой и энергетической ценности пищевых продуктов

Важнейшая физиологическая роль продуктов питания заключается в обеспечении организма человека пищевыми веществами и энергией. Пищевые вещества используются для построения и обновления органов и тканей, а энергия затрачивается на поддержание постоянной температуры тела, осуществление биохимических процессов, выполнение механической работы, переваривание и усвоение пищи.

Среди пищевых веществ выделяют макронутриенты, или основные пищевые вещества, и микронутриенты. Макронутриенты — белки, жиры и углеводы, — необходимые человеку в десятках граммов, при окислении выделяют энергию для выполнения различных функций в организме, а микронутриенты — витамины и минеральные вещества, — потребляемые в миллиграммах или микрограммах, не являются источниками энергии, но активно участвуют в процессах роста и регуляции обмена веществ.

Химический состав и функции компонентов современных продуктов питания в организме человека реализуются через понятие «пищевая ценность».

Пищевая ценность — определение, отражающее полноту полезных свойств пищевого продукта, заключающееся в обеспечении физиологических потребностей человека в основных пищевых веществах и энергии. Этот показатель характеризуется химическим составом, соотношением нутриентов, биологической, энергетической ценностью, доброкачественностью и органолептическими свойствами продуктов.

Энергетическая ценность пищевых продуктов оценивается энергией, которая может высвободиться в процессе биологического окисления в форме макроэргических фосфатов, в основном АТФ, и восстанавливающих эквивалентов 2 Н. Последние расходуются на выполнение различных реакций и функций в организме.

Пищевая и энергетическая ценность продуктов питания должна не только соответствовать физиологическим потребностям различных групп населения для удовлетворения организма в необходимых количествах веществ и энергии, но и обеспечивать профилактическую направленность изделий и предупреждать хронические заболевания человека. Поэтому, в соответствии с современными требованиями этикетирования продуктов питания, пищевая и энергетическая ценность обязательно должны указываться на упаковке готовых изделий, чтобы каждый потребитель мог составить сбалансированный рацион пищи, а специалисты — разрабатывать рецептуры продуктов для здорового питания человека.

Энергия, заключенная в составе пищевых продуктов, рассчитывается с учетом содержания в них основных питательных веществ (белки, жиры, углеводы) и количества энергии, усваиваемой организмом из 1 г каждого из них.

Для расчета энергетической ценности продуктов питания применяют стандартные факторы конверсии, которые получают путем округления данных теплоты сгорания и с учетом всасываемости веществ. Обозначаются они как коэффициенты энергетической ценности (ккал/г) (табл. 11.1).

Таблица 11.1

Теплота сгорания и энергия, усваиваемая из пищевых веществ

Пищевые вещества	Теплота сгорания ¹⁾		Энергия окисления у человека		Стандартный фактор конверсии	
	ккал/г	кДж/г	ккал/г	кДж/г	ккал/г	кДж/г
Белки	5,4	22,6	4,1	17,2	4	17
Жиры	9,3	38,9	9,3	38,9	9	38
Углеводы («по разности») ²⁾	4,1	17,2	4,1	17,2	4	17
Сумма моно- и дисахаридов	3,8	15,9	3,8	15,9	3,8	15
Крахмал, определенный экспериментально	4,1	17,2	4,1	17,2	4	17
Клетчатка	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
Органические кислоты:						
уксусная	3,5	14,6	3,5	14,6	3,5	14
яблочная	2,4	10,0	2,4	10,0	2,4	10
молочная	3,6	15,0	3,6	15,0	3,6	15
лимонная	2,5	10,4	2,5	10,4	2,5	10
Этанол	7,1	29,7	7,1	29,7	7	29

¹⁾ Определяется в бомбовом калориметре²⁾ Для определения содержания углеводов «по разности» из сухого остатка продукта вычитают количество белков, жиров и золы.

На основании химического состава можно рассчитать энергетическую ценность пищевых продуктов на 100 г по формуле:

$$\mathcal{E} = K_b \cdot m_b + K_{ж} \cdot m_{ж} + K_y \cdot m_y + K_{кисл} \cdot m_{кисл}$$

где \mathcal{E} — энергетическая ценность пищевого продукта, ккал/100 г; K_b , $K_{ж}$, K_y , $K_{кисл}$ — коэффициенты энергетической ценности, ккал/г (см. табл. 11.1); m_b , $m_{ж}$, m_y , $m_{кисл}$ — массовая доля белков жиров, углеводов, органических кислот, г/100 г.

Расчет энергетической ценности алкогольных напитков, обусловленной этанолом производят по следующей формуле:

$$\mathcal{E} = \frac{\text{Объем} \times \text{Крепость (об.\%)}}{100 \cdot 0,8 \cdot 7},$$

где 0,8 — удельный вес этанола, 7 — калорийность 1 г этанола.

Суточные энергозатраты человека зависят от пола, возраста, физической активности, климата, конституции тела. Общая потребность в энергии для «среднего» взрослого человека, занятого легким физическим трудом, принята 2500 ккал в сутки. В целом же потребность в килокалориях для конкретного человека может быть уточнена и рассчитана по формуле:

$$СЭ = (ВОО \cdot КФА) + ПТ,$$

где СЭ — суточные энергозатраты, ккал/сут; ВОО — величина основного обмена, ккал/сут; КФА — коэффициент физической активности (1...7,9); ПТ — пищевой термогенез.

При нормальном телосложении ВОО в среднем равняется 1 ккал/ч на 1 кг массы тела у мужчин и 0,9 ккал/ч на 1 кг — у женщин. Данная энергия расходуется на дыхание, кровообращение и другие обменные процессы в состоянии физического покоя.

В 1985 г. ФАО/ВОЗ предложили формулы для расчета величины ВОО, которые приведены в табл. 11.2. Для вычисления суточных энергозатрат человека КФА можно найти в специальной литературе, а пищевой термогенез рассчитать как 10 % от общих суточных энергозатрат (основной обмен и КФА).

В соответствии с контрольным заданием, студент рассчитывает суточные энергозатраты для человека с определенным видом занятий, возрастом, полом и составляет рацион с учетом пищевой и энергетической ценности продуктов.

Цель работы: освоение методов расчета пищевой и энергетической ценности продуктов питания на основании рецептов и химического состава.

Массовую долю макро- и микронутриентов пищевых продуктов берут из справочных таблиц, рецептуры — из специальных справочников и руководств.

Таблица 11.2
Формулы расчета величины ВОО

Возраст, годы	Формула ¹⁾ , ккал/день	
	Мальчики, мужчины	Девочки, женщины
0...3	$60,9 \times \text{вес} - 54$	$61 \times \text{вес} - 51$
3...10	$22,7 \times \text{вес} + 495$	$22,5 \times \text{вес} + 499$
10...18	$17,5 \times \text{вес} + 651$	$12,2 \times \text{вес} + 746$
18...30	$15,3 \times \text{вес} + 679$	$14,7 \times \text{вес} + 496$
30...60	$11,6 \times \text{вес} + 879$	$8,7 \times \text{вес} + 829$
Больше 60	$13,5 \times \text{вес} + 487$	$10,5 \times \text{вес} + 596$

¹⁾ Вес в формулах указывается в кг.

Пример. Рассчитать энергетическую и пищевую ценность диетических галет «Спортивные», содержащих повышенное количество сахара и жира.

Рецептура галет, кг:

Мука пшеничная высшего сорта	751,78
Сахар-песок	117,48
Дрожжи прессованные	18,80
Масло сливочное	187,94
Молоко пастеризованное 3,5 % жирности	147,13
Меланж	28,18
Соль	4,69
Сода питьевая	2,34
Итого	1258,34

Содержание белков в галетах, кг:

Мука пшеничная в/с	$\frac{751,78 \cdot 11}{100} = 82,69$
Дрожжи прессованные	$\frac{18,8 \cdot 12,7}{100} = 2,38$
Молоко пастеризованное 3,5 % жирности	$\frac{147,13 \cdot 12,79}{100} = 4,10$
Масло сливочное	$\frac{187,94 \cdot 0,5}{100} = 0,94$
Меланж	$\frac{28,18 \cdot 12,7}{100} = 3,57$
Всего	93,68

Содержание жиров в галетах, кг:

Мука пшеничная в/с	$\frac{751,78 \cdot 1,1}{100} = 8,26$
Дрожжи прессованные	$\frac{18,8 \cdot 2,7}{100} = 0,50$
Молоко пастеризованное 3,5 % жирности	$\frac{147,13 \cdot 3,5}{100} = 5,14$
Масло сливочное	$\frac{187,94 \cdot 82,5}{100} = 155,05$
Меланж	$\frac{28,18 \cdot 11,5}{100} = 3,24$
<u>Всего</u>	172,19

Содержание углеводов в галетах, кг:

Мука пшеничная в/с	$\frac{751,78 \cdot 68,7}{100} = 516,47$
Сахар-песок	$\frac{117,48 \cdot 99,8}{100} = 117,24$
Молоко пастеризованное 3,5 % жирности	$\frac{147,13 \cdot 4,69}{100} = 6,90$
Меланж	$\frac{28,18 \cdot 11,5}{100} = 3,24$
<u>Всего</u>	640,80

Массовая доля основных веществ в галетах, %:

Белки	$\frac{93,68 \cdot 100}{1258,34} = 7,44$
Жиры	$\frac{172,19 \cdot 100}{1258,34} = 13,68$
Углеводы	$\frac{640,80 \cdot 100}{1258,34} = 50,92$

Массовая доля минеральных веществ и витаминов, мг/100 г:

Калий	104,1
Фосфор	76,2
В ₁ (тиамин)	0,12
РР (на ниациновый эквивалент)	7,43

Энергетическая ценность галет «Спортивные» составляет:

$$\mathcal{E} = 4 \cdot 7,44 + 9 \cdot 13,68 + 4 \cdot 50,92 = 357,1 \text{ ккал/100 г.}$$

В табл. 11.3 приведены рекомендуемые величины физиологической потребности человека в основных пищевых веществах и энергии.

Таблица 11.3
Суточная потребность взрослого человека (18...29 лет)
в основных пищевых веществах и энергии

Пищевые вещества	Суточная потребность
Белки, г	73
Усвояемые углеводы, г	365
В том числе моно- и дисахариды	50
Жиры, г	83
В том числе:	
полиненасыщенные жирные кислоты, г	4
холестерин, мг	300
фосфолипиды, г	5
Органические кислоты, г	2
Балластные вещества (клетчатка, пектин), г	25
Минеральные вещества, мг:	
кальций	800
фосфор	1200
калий	3500
магний	400
железо	14
цинк	15
йод	0,15
Витамины:	
А (на ретиноловый эквивалент), мкг	900
В ₁ (тиамин), мг	1,3
В ₂ (рибофлавин), мг	1,5
В ₆ (пиридоксин), мг	1,9
В ₉ (фолиевая кислота), мкг	200
В ₁₂ (кобаламин), мкг	3
С (аскорбиновая кислота), мг	70
D (кальциферол), мкг	2,5
Е (на токофероловый эквивалент), мг	9
РР (на ниациновый эквивалент), мг	16
Энергетическая ценность, ккал	2500

Сравнивая пищевую ценность галет с рекомендуемыми величинами физиологической потребности (табл. 11.3), рассчитывают процент удовлетворения человека в сутки в пищевых веществах, находящихся в 100 г продукта:

Белки.....	$\frac{100 \cdot 7,44}{73} = 10,2 \%$
Жиры.....	$\frac{100 \cdot 13,68}{83} = 16,5 \%$
Углеводы.....	$\frac{100 \cdot 50,92}{365} = 13,9 \%$

Следовательно, 100 г галет «Спортивные» удовлетворяют суточную потребность организма в энергии на 14,2 %, в белках — 10,2 %, жирах — 16,5 %, углеводах — 13,9 %, калии — 3 %, фосфоре — 7,6 %, витамине В₁ — 7,9 %, витамине РР — 37,1 %.

Получив варианты индивидуальных заданий, студенты рассчитывают пищевую и энергетическую ценность для различных пищевых продуктов и определяют процент удовлетворения в энергозатратах для различных групп населения, возраста и рода занятий.

Результаты расчетов заносят в таблицу (табл. 11.4).

Таблица 11.4

Показатели пищевой (ПЦ) и энергетической ценности (ЭЦ) продукта

Наименование пищевого вещества	Массовая доля вещества, %	ЭЦ, ккал/100 г	Показатели ПЦ	
			Суточная потребность, г, мг, мкг	Удовлетворение суточной потребности, %
Белки				
Жиры				
Углеводы				
Органические кислоты				
Минеральные вещества:				
кальций				
фосфор				
магний				
калий				
Витамины:				
В ₁				
В ₂				
В ₆ и т. д.				

Лабораторная работа 11.2

Методы оценки качества белка и биологической ценности пищевых продуктов

Белковые вещества составляют значительную часть живых организмов. Они наделены рядом специфических функций, поэтому являются незаменимыми компонентами рациона пищи человека.

Вещества, которые не синтезируются в организме, но обязательно необходимы для него, называются *незаменимыми* или *эссенциальными*. Вещества, легко образующиеся и также необходимые для организма в определенных количествах, называются *заменимыми*.

Человек испытывает потребность как в общем количестве белка, так и в определенном количестве незаменимых аминокислот. Восемь из 20 аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин и триптофан) относятся к незаменимым, т. е. они не синтезируются в организме человека и обязательно должны поступать с пищей. Гистидин и аргинин являются обязательными компонентами для молодого растущего организма.

Отсутствие в организме полного набора незаменимых аминокислот приводит к отрицательному азотистому балансу, нарушению скорости синтеза белка, остановке роста, нарушению деятельности органов и систем. При недостатке хотя бы одной из незаменимых аминокислот в организме наблюдается перерасход белка для обеспечения в полном объеме физиологических потребностей в незаменимых аминокислотах. Избыточные аминокислоты будут неэффективно расходоваться на энергетические цели или превращаться в запасные вещества (жир, гликоген).

Оценка качества белка

Наличие полного набора незаменимых аминокислот в достаточном количестве и в определенном соотношении с заменимыми аминокислотами характеризуется понятием «качество» пищевого белка. Качество белка является составной частью определения «пищевая ценность» продуктов, и оценивается оно с помощью биологических и химических методов. Биологическими методами определяют биологическую ценность (БЦ), чистую утилизацию белка (ЧУБ) и коэффициент эффективности белка (КЭБ), химическими методами — аминокислотный скор.

Биологические методы предполагают использование опытов на молодых животных с включением в их рацион исследуемого белка или пищевых продуктов с ним.

Биологическая ценность белка (БЦ). Показатель отражает долю задержки азота в организме от всего количества всосавшегося азота. Контрольная группа животных получает безбелковый рацион ($N_{\text{конт}}$), опытная — испытуемый белок. В обеих группах определяется количество азота, выделяемого с калом ($N_{\text{к}}$), мочой ($N_{\text{м}}$) и потребленного с пищей ($N_{\text{потр}}$).

$$\text{БЦ} = N_{\text{потр}} - N_{\text{к}} - N_{\text{м}} - N_{\text{конт}}$$

При БЦ, равном 70 % и более, белок способен обеспечивать рост организма.

Чистая утилизация белка (ЧУБ). Данный показатель рассчитывается умножением БЦ на коэффициент перевариваемости белка.

$$\text{ЧУБ} = \text{БЦ} \cdot K_{\text{пер}}$$

Коэффициент перевариваемости изменяется от 65 % для некоторых растительных белков до 97 % — для белка яиц.

Коэффициент эффективности белка (КЭБ) отражает прирост массы тела на 1 г потребленного белка. Он определяется при 9 % исследуемого белка по калорийности в рационе животных. В качестве контрольного рациона используется рацион крыс с казеином, КЭБ которого равен 2,5.

Аминокислотный скор белка (АКС). Расчет аминокислотного сора основан на сравнении аминокислотного состава белка пищевых продуктов с аминокислотным составом эталонного («идеального») белка. Эталонный белок отражает состав гипотетического белка высокой пищевой ценности, идеально удовлетворяющий физиологическую потребность организма в незаменимых аминокислотах. Аминокислотный состав такого белка предложен Комитетом ФАО/ВОЗ в 1985 г и показывает содержание каждой из незаменимых аминокислот в 1 г белка (табл. 11.5).

Скор выражают безразмерной величиной или в процентах:

$$\text{АКС} = \frac{\text{мг АК в 1 г белка}}{\text{мг АК в 1 г эталона}} \cdot 100.$$

Аминокислота, скор которой имеет наименьшее значение, называется *лимитирующей*. В продуктах с низкой биологической ценностью лимитирующих аминокислот со скором менее 100 % может быть не-

Таблица 11.5

**Аминокислотная шкала и суточная потребность в незаменимых аминокислотах
в различном возрасте**

Аминокислоты	Эталонный белок, мг/кг белка	Дети 2...5 лет	Дети 10...12 лет	Подростки	Взрослые
		мг/кг массы тела в сутки			
Изолейцин	28	31	28	13	10
Лейцин	66	73	44	19	14
Лизин	58	64	44	16	14
Метионин + цистеин	25	27	22	17	13
Фенилаланин + тирозин	63	69	22	19	14
Треонин	34	37	28	9	7
Триптофан	11	12,5	9	5	3,5
Валин	35	38	25	13	10

сколько. В таком случае речь идет о первой, второй и третьей лимитирующей аминокислотах. В качестве лимитирующих аминокислот часто выступают лизин, треонин, триптофан и серосодержащие аминокислоты (метионин, цистеин).

Белки злаковых культур (пшеница, рожь, овес, кукуруза) лимитированы по лизину, треонину, некоторых бобовых культур — по метионину и цистеину. Наиболее близки к «идеальному» белку белки яйца, мяса, молока.

Биологическая ценность белков в процессе тепловой, механической, ультразвуковой или других видов обработки, а также транспортирования и хранения может понижаться, особенно за счет взаимодействия незаменимых аминокислот, часто лизина, с другими компонентами. При этом образуются недоступные для переваривания в организме человека соединения. В то же время БЦ и АКС белков могут быть повышены путем составления смесей продуктов или добавления недостающих и лабильных незаменимых аминокислот. Так, например, сочетание белков пшеницы и соевых бобов при определенных соотношениях обеспечивает полноценный набор аминокислот.

Цель работы: освоение расчетных методов оценки качества белка, исходя из его аминокислотного состава.

Получив контрольное задание у преподавателя, студенты рассчитывают аминокислотный скор белков различных пищевых продуктов, их смесей, композиций или объектов, подвергнувшихся различ-

ным способам и факторам технологической обработки или условиям хранения.

Аминокислотный скор. Пример. По данным аминокислотного состава рассчитать АКС смеси, состоящей из пшеничной муки и соевого концентрата, взятых в соотношении 70 : 30.

Из данных, приведенных табл. 11.6, видно, что в 100 г пшеничной муки содержится 10,3 г белка и 311 мг треонина, следовательно, 1 г белка пшеничной муки будет содержать

$$\frac{311}{10,3} = 30,19 \text{ мг треонина.}$$

Таблица 11.6

Массовая доля белка и содержание незаменимых аминокислот в продуктах

Пищевой продукт	Белок, %	Незаменимые аминокислоты, мг/100 г									
		Иле	Лей	Лиз	Мет	Цис	Фен	Тир	Тре	Три	Вал
Молоко	3,2	189	283	261	83	26	175	184	153	50	191
Говядина	21,6	939	1624	1742	588	310	904	800	875	273	1148
Куры	18,2	693	1412	1588	471	224	744	641	885	126	877
Треска	16,0	700	1300	1500	500	200	800	600	900	210	900
Яйцо (белок)	11,1	628	917	683	413	277	673	397	483	169	735
Картофель	2,0	86	128	135	26	97	98	90	97	28	122
Соя	34,9	1810	2670	2090	520	550	1610	1060	1390	450	2090
Мука пшеничная	10,3	430	806	250	153	200	500	250	311	100	471
Мука ржаная	10,7	400	690	360	150	210	600	290	320	130	520
Крупа рисовая	7,0	330	620	260	160	137	370	290	240	100	420
Крупа гречневая	12,6	460	745	530	320	330	592	430	400	180	590

По данным табл. 11.7, 1 г белка соевого концентрата содержит 45 мг треонина, следовательно, 1 г смеси, состоящей из пшеничной муки и соевого концентрата, взятых при соотношении 70 : 30, будет содержать треонина:

$$0,7 \cdot \frac{30,19}{1} + 0,3 \cdot \frac{45}{1} = 21,1 + 13,5 = 34,6 \text{ мг.}$$

В «идеальном» белке содержится 34 мг/г треонина, следовательно, АКС для треонина, в соответствии с формулой, приведенной на с. 166, равен $34,6/34 = 100\%$.

Таблица 11.7

Аминокислотный состав белковых препаратов, мг/г белка

Белковые препараты	Изолейцин	Лейцин	Лизин	Метионин + цистеин	Фенилаланин + тирозин	Треонин	Триптофан	Валин
Соевые:								
мука	46	78	64	26	88	39	14	46
концентрат	48	79	64	28	89	45	16	50
изолят	49	82	64	26	92	38	14	50
Белковая мука из пшеничных отрубей	37	84	62	54	94	42	12	48
Пшеничная клейковина	31	66	19	42	84	25	10	37
Казеин	59	91	93	27	85	39	5	77

Лимитирующей незаменимой аминокислотой считается та аминокислота, АКС которой наименьший.

Коэффициент различия аминокислотных скоров (КРАС, %) показывает избыточное количество НАК, не используемых на пластические нужды, и рассчитывается он как средняя величина избытка АКС незаменимой аминокислоты относительно наименьшего скоры той или иной кислоты:

$$\text{КРАС} = \frac{\sum \Delta \text{РАС}}{n} \% ; \Delta \text{РАС} = \Delta \text{АКС}_i + \text{АКС}_{\min}$$

где $\Delta \text{РАС}$ — различие аминокислотного скоры аминокислоты, %; n — количество НАК; $\Delta \text{АКС}_i$ — избыток скоры i -ой аминокислоты, % ($\Delta \text{АКС}_i = \text{АКС}_i - 100$, АКС_i — аминокислотный скор для i -ой незаменимой кислоты); АКС_{\min} — скор лимитирующей кислоты, %.

Коэффициент утилизации i -НАК (K_i) — характеристика, отражающая сбалансированность НАК по отношению к эталонному белку. Рассчитывается по формуле:

$$K_i = \frac{\text{АКС}_{\min}}{\text{АКС}_i}$$

Коэффициент рациональности аминокислотного состава (R_i) отражает сбалансированность НАК относительно эталона и рассчитывается по формуле:

$$R_c = \frac{\sum_{i=1}^k (A_i K_i)}{\sum_{i=1}^n A_i},$$

где K_i — коэффициент утилитарности i -НАК; A_i — массовая доля i -ой аминокислоты в г эталонного белка, мг/г.

Результаты расчета показателей аминокислотного состава, отражающие качество пищевого белка, оформляются в виде табл. 11.8, и делаются косвенные выводы о биологической ценности того или иного продукта.

Таблица 11.8

Показатели аминокислотного состава белков

Аминокислота	Содержание, мг/г белка		АКС, %	КРАС, %	Лимитирующие АК		K_i	R_c
	эталонный	исследуемый			первая	вторая		
Изолейцин								
Лейцин								
Лизин								
Метионин + + цистеин								
Фенилаланин + + тирозин								
Треонин								
Триптофан								
Валин								

Лабораторная работа 11.3

Гидролитическое расщепление белка ферментами поджелудочной железы

Белки пищи, попадая в желудок, подвергаются гидролитическому распаду под действием пепсина желудочного сока с оптимумом действия рН 1,5...2,5. Пептиды, образовавшиеся в желудке, и белки, поступившие в двенадцатиперстную кишку в непереваренном виде, являются субстратом для действия протеолитических ферментов, выделяющихся главным образом поджелудочной железой и частично клетками слизистой оболочки тонкого кишечника.

В соке поджелудочной железы содержатся трипсин, химотрипсин и карбоксипептидаза. Трипсин и химотрипсин выделяются в виде неактивных проферментов (зимогенов). Под влиянием фермента энтерокиназы кишечного сока трипсиноген превращается в активный трипсин, а химотрипсиноген под действием трипсина — в химотрипсин. Под влиянием активных форм ферментов происходит гидролитический разрыв пептидных связей и образование низкомолекулярных полипептидов и небольшого количества свободных аминокислот.

Трипсин с наибольшей скоростью расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильными группами лизина и аргинина, химотрипсин — карбоксильными группами метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана.

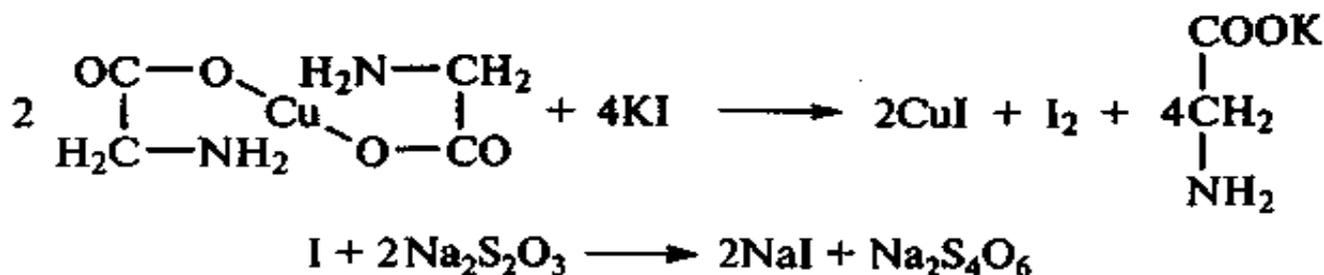
Дальнейшее расщепление полипептидов происходит под действием карбоксипептидазы, аминопептидазы и дипептидаз. Последние два вида и ферментов содержатся в соке тонких кишок. Карбоксипептидаза катализирует процесс гидролиза полипептида со стороны свободной карбоксильной группы, аминопептидаза — со стороны свободной аминогруппы. Дипептиды, при участии дипептидаз, расщепляются на свободные аминокислоты. В итоге, конечными продуктами распада белков в желудочно-кишечном тракте являются аминокислоты, усваиваемые организмом.

Цель работы: освоение метода гидролитического расщепления белка ферментами поджелудочной железы *in vitro*.

Определив содержание азота α -аминокислот в белке до его контакта с ферментом и через некоторое время после расщепления, устанавливают интенсивность процесса гидролиза полипептида.

Принцип метода определения содержания азота аминокислот (аминный азот) заключается в том, что α -аминокислоты и пептиды образуют комплексные соединения с ионами двухвалентной меди. Эти соединения реагируют с йодистым калием в кислой среде с выделением йода, который оттитровывается серноватисто-кислым натрием (тиосульфатом).

Реакции протекают по следующим уравнениям:



Материал, реактивы, оборудование:

- ♦ Желатин, 1 %-ный раствор.
- ♦ Панкреатин (препарат поджелудочной железы): 2 г препарата растворяют в 20 см³ 1 %-ного раствора гидрокарбоната натрия. Раствор фильтруют.
- ♦ Хлорная медь: 27,3 г соли растворяют в мерной колбе на 1 дм³ и доводят водой до метки; натрий фосфорнокислый трехзамещенный (Na₃PO₄ · 12H₂O): 68,5 г соли растворяют в мерной колбе на 1 дм³ и доводят водой до метки.
- ♦ Боратный буфер (рН 8,8): 28,6 г буры (тетраборнокислого натрия) растворяют в 750 см³ воды в мерной колбе на 1 дм³, прибавляют 50 см³ 1 н. раствора соляной кислоты и доводят водой до метки; суспензия фосфорнокислой меди в боратном буфере: 100 см³ раствора хлорной меди смешивают с 200 см³ раствора трехзамещенного фосфорнокислого натрия и добавляют 200 см³ боратного буферного раствора. Суспензию готовят не более, чем на один день. Тимолфталейн: 0,25 г индикатора растворяют в 100 см³ 50 %-ного этилового спирта; тиосульфат натрия (Na₂S₂O₃ · 5H₂O), 0,1 н. раствор. Перед употреблением из него готовят 0,01 н. раствор.
- ♦ Крахмал, 0,5 %-ный раствор; йодистый калий (KI), 10 %-ный раствор, его готовят перед употреблением.
- ♦ Уксусная кислота, концентрированная.
- ♦ Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 10 %-ный раствор.
- ♦ Едкий натр, 1 н. раствор. Колбы конические на 50 см³.
- ♦ Пипетки стеклянные на 2, 10, 20 см³.
- ♦ Колбы мерные на 2,5 см³.
- ♦ Капельницы стеклянные.
- ♦ Баня водяная.
- ♦ Термостат.

Методика проведения анализа. Нумеруют конические колбы емкостью по 50 см³. В колбы вносят по 2 см³ раствора панкреатина. В колбах 3 и 4 нагреванием в кипящей водяной бане в течение 5 мин инактивируют ферменты, в колбе 1 и 2 остаются активные ферменты.

В колбы 1 и 3 пипеткой вносят по 20 см³ раствора желатина, в колбы 2 и 4 — по 20 см³ дистиллированной воды. Растворы во всех колбах перемешиваются и немедленно отбирают из каждой колбы по 2...5 см³ смеси в мерные колбы на 25 см³ для определения азота аминокислот.

В каждую мерную колбу еще до внесения смеси наливают по 2 см³ 10 %-ного раствора ТХУ для инактивирования ферментов. В первую

очередь добавляют ТХУ в колбу 1. Растворы в мерных колбах используют для определения содержания азота аминокислот.

Все исходные смеси в конических колбах ставят на 1 ч в термостат при температуре 38 °С.

Для определения азота аминокислот в каждую мерную колбу прибавляют 2 капли раствора тимолфталейна и по каплям 1 н. раствор едкого натра до светло-голубого окрашивания (рН 10,2). К нейтрализованным растворам доливают по 10 см³ суспензии фосфорнокислой меди и тщательно перемешивают. Если весь объем суспензии прореагировал, добавляют еще 5 см³.

Колбы доводят водой до метки, хорошо перемешивают и смесь фильтруют через фильтр из плотной бумаги или центрифугируют.

В две конические колбы пипеткой вносят по 10 см³ фильтрата, прибавляют по 0,5 см³ уксусной кислоты и 5 см³ 10 %-ного раствора йодистого калия (или 0,5 г порошка KI). Выделившийся йод тотчас же оттитровывают 0,01 н. раствором тиосульфата натрия. Раствор тиосульфата добавляют до тех пор, пока окраска жидкости в колбе не станет светло-желтой, после чего приливают 5...6 капель раствора крахмала и дотитровывают тиосульфатом до обеспечения синей окраски.

На основании результатов титрований вычисляют содержание азота аминокислот во всем объеме каждого из исходных растворов (конические колбы).

Данные, характеризующие содержание аминного азота в колбах 2 или 4, будут указывать на количество свободного азота аминокислот в 2 см³ ферментного препарата. Разность в содержании азота аминокислот в колбах 3 и 4 указывает на количество азота свободных аминногрупп в 20 см³ раствора желатина. Разность в содержании аминного азота в колбах 1 и 2 должна быть практически такой же, как и в колбах 3 и 4.

После часа инкубации конические колбы вынимают из термостата и повторяют определения аминного азота. Данные анализа пересчитывают на исходный объем смеси — 22 см³ (2 см³ раствора панкреатина + 20 см³ раствора желатина или воды).

Разность между содержанием аминного азота в колбах 3 и 4 должна быть такой же, как и до инкубации; разность между колбами 1 и 2 должна возрасти после инкубации, по сравнению с той же величиной в начале опыта.

Содержание азота аминокислот (мг) в исходном растворе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0,28 \cdot 25 \cdot 22}{10 \cdot 2},$$

где 0,28 — 1 см³ 0,01 н. раствора тиосульфата натрия соответствует 0,28 мг азота аминокислот; 25 — объем мерной колбы, см³; 22 — объем раствора в конической колбе, см³; 2 — объем раствора, взятый из конической в мерную колбу, см³; 10 — объем фильтрата, используемый для титрования, см³; V — объем 0,01 н. раствора тиосульфата натрия, пошедший на титрование, см³.

Делают выводы о накоплении свободных аминокислот при гидролизе желатина под влиянием ферментов поджелудочной железы (панкреатин) и инактивации процесса при температурной обработке ферментов.

Постановка задачи в лабораторной работе может быть расширена изучением влияния времени гидролиза, наличия активаторов или ингибиторов, рН среды и других факторов на накопление свободных аминокислот, с последующим оформлением результатов в виде графиков.

Лабораторная работа 11.4

Свойства и качественные реакции на стерины и желчные кислоты

Незаменимыми компонентами продуктов питания для организма человека являются стерины и их производные. Наиболее распространенными стеринами являются холестерин и желчные кислоты. Холестерин и его эфиры являются важными составляющими структур клеточных мембран, предшественниками солей желчных кислот, половых гормонов, гормонов коры надпочечников и витамина D. Нарушение обмена холестерина сопровождается развитием признаков атеросклероза и образованием желчных камней. Патология сводится к отложению его избытка в виде бляшек на стенках кровеносных сосудов и артериях, приводящих к расстройству мозгового кровообращения, гипертонии и накоплению желчных камней, способных вызывать закупоривание желчного протока.

Холестерин содержится в сливочном масле, яйцах, сыре и мясе в количествах от 0,06 до 1,61 %, в нервной и мозговой ткани животных и человека. Растительные масла содержат стигмастерин и β-ситостерин.

Жиры, поступающие в организм человека с пищей, в двенадцатиперстной кишке смешиваются с панкреатическим соком, содержа-

щим липазу и буферные смеси, и с желчью, в состав которой входят соли желчных кислот. В результате образуется эмульсия, из которой с внешних концов молекулы жира освобождаются свободные жирные кислоты.

Действие липазы при переваривании жира приведено на рис. 11.1.

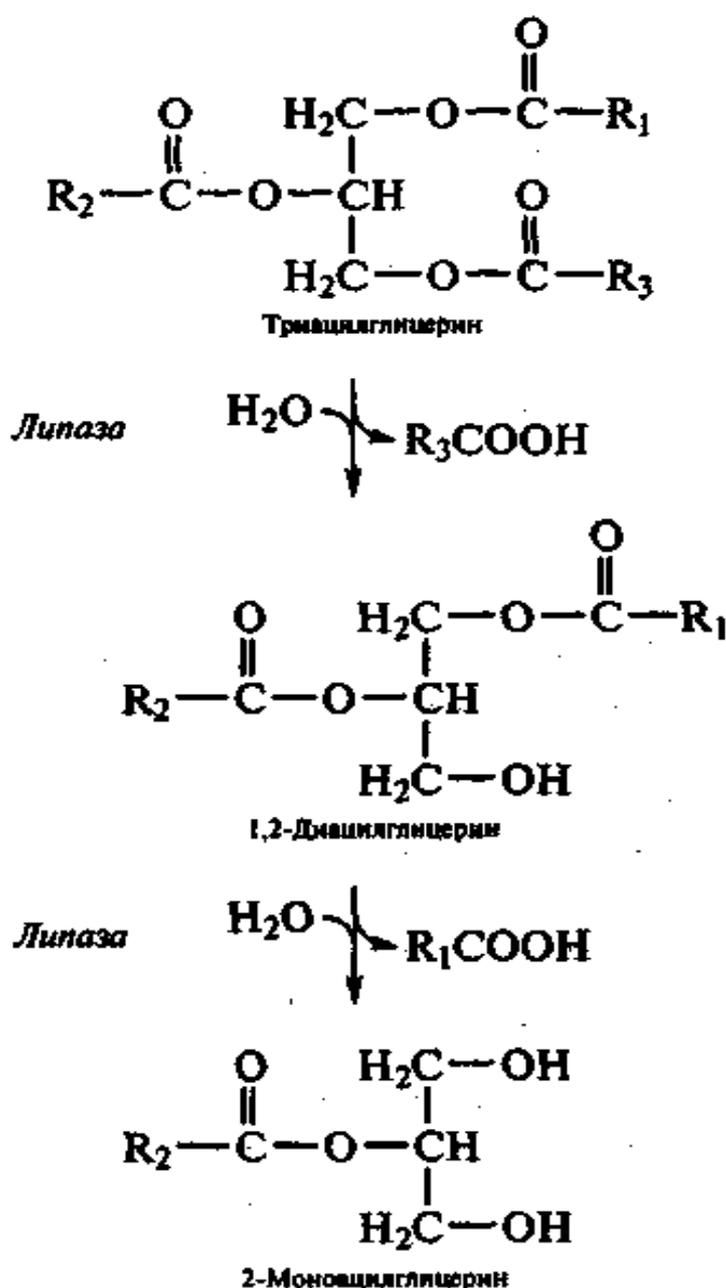


Рис. 11.1. Действие липазы при переваривании жира

Соли желчных кислот представляют собой производные стероидов. Образуются они при окислении холестерина в печени. Соединения обладают поверхностно-активными свойствами: стероидная часть имеет характерные для липидов гидрофобные свойства, а окисленные боковые цепи, к которым присоединены

остатки аминокислот глицина или таурина, — гидрофильные свойства (рис. 11.2).



Рис. 11.2. Принцип поверхностно-активного действия солей желчных кислот

Гидрофобные концы молекулы в просвете кишечника легко смешиваются с липидами, а гидрофильные облегчают контакт липидов с водной фазой. Тонкая эмульсия, состоящая из мельчайших капелек, облегчает взаимодействие жиров с липазами при гидролизе. Таким образом, соли желчных кислот выступают в роли активаторов процесса переваривания жира при пищеварении.

В клетках слизистой оболочки кишечника высшие жирные кислоты и моноацилглицерины вступают в реакцию переэтерификации и образуют триацилглицерины, которые в виде крупной капли, окруженной слоем белка и фосфолипидов (хиломикроны), проникают в лимфатические сосуды и попадают в кровь.

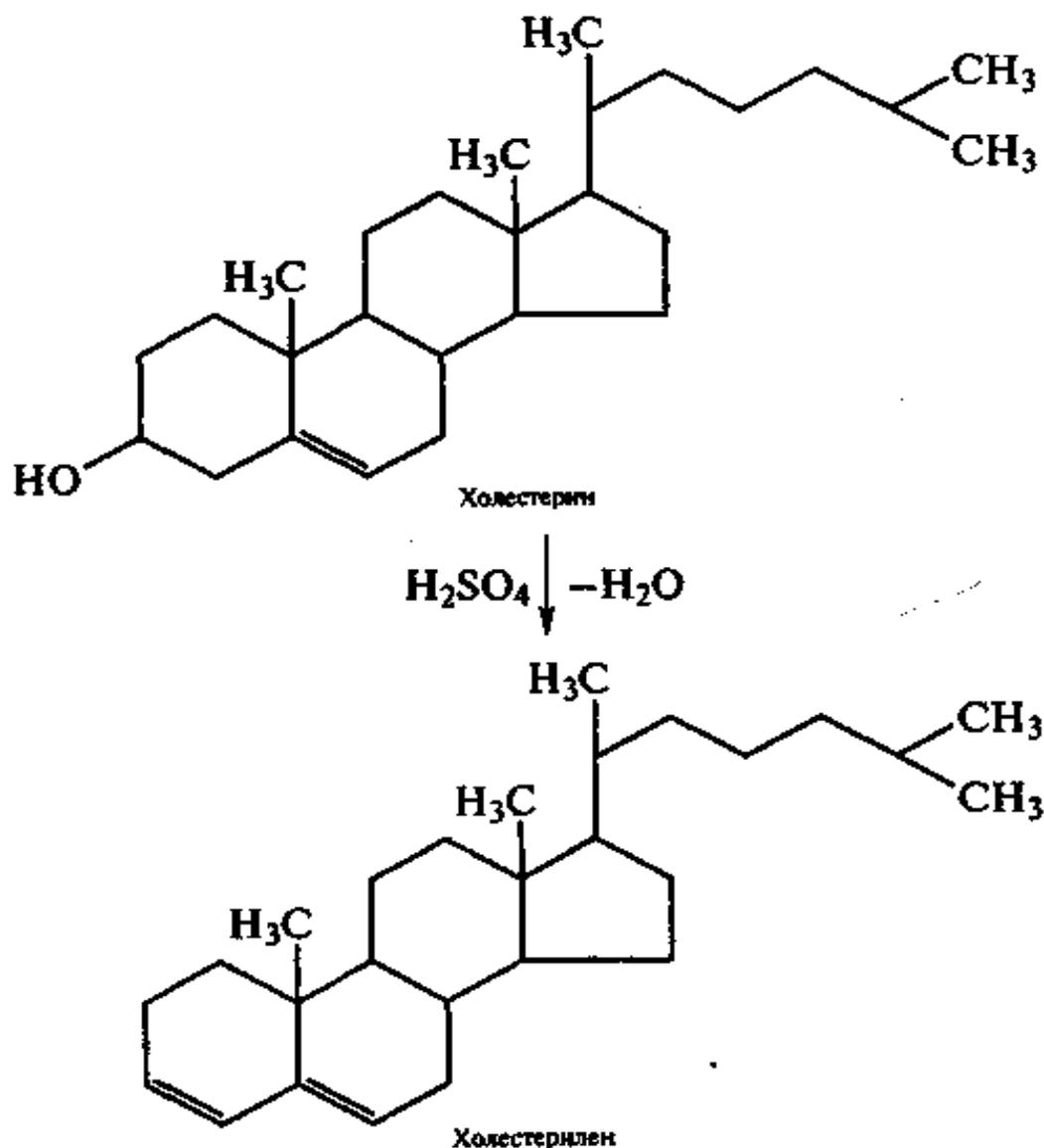
Холестерин с солями желчных кислот также образует мицеллы, проникает в клетки слизистой оболочки кишечника и, попадая в общий кровоток, доставляется в печень. В печени холестерин подвергается этерификации, оставаясь в ее мембранах, либо превращается в соли желчных кислот. Избыток холестерина выводится из организма с продуктами обмена и желчью.

Цель работы: изучение свойств и качественных реакций на стеринны и желчные кислоты.

Качественные реакции на стеринны

В пищевых продуктах или тканях организма стеринны можно обнаружить характерными реакциями с серной кислотой и уксусным ан-

гидридом. Стерины хорошо растворимы в ряде органических растворителей и прежде всего в хлороформе.



Реакция с серной кислотой (реакция Шиффа)

Под действием серной кислоты происходит дегидратация молекулы стерина и образование стерилена — продукта красного цвета.

Материал, реактивы и оборудование:

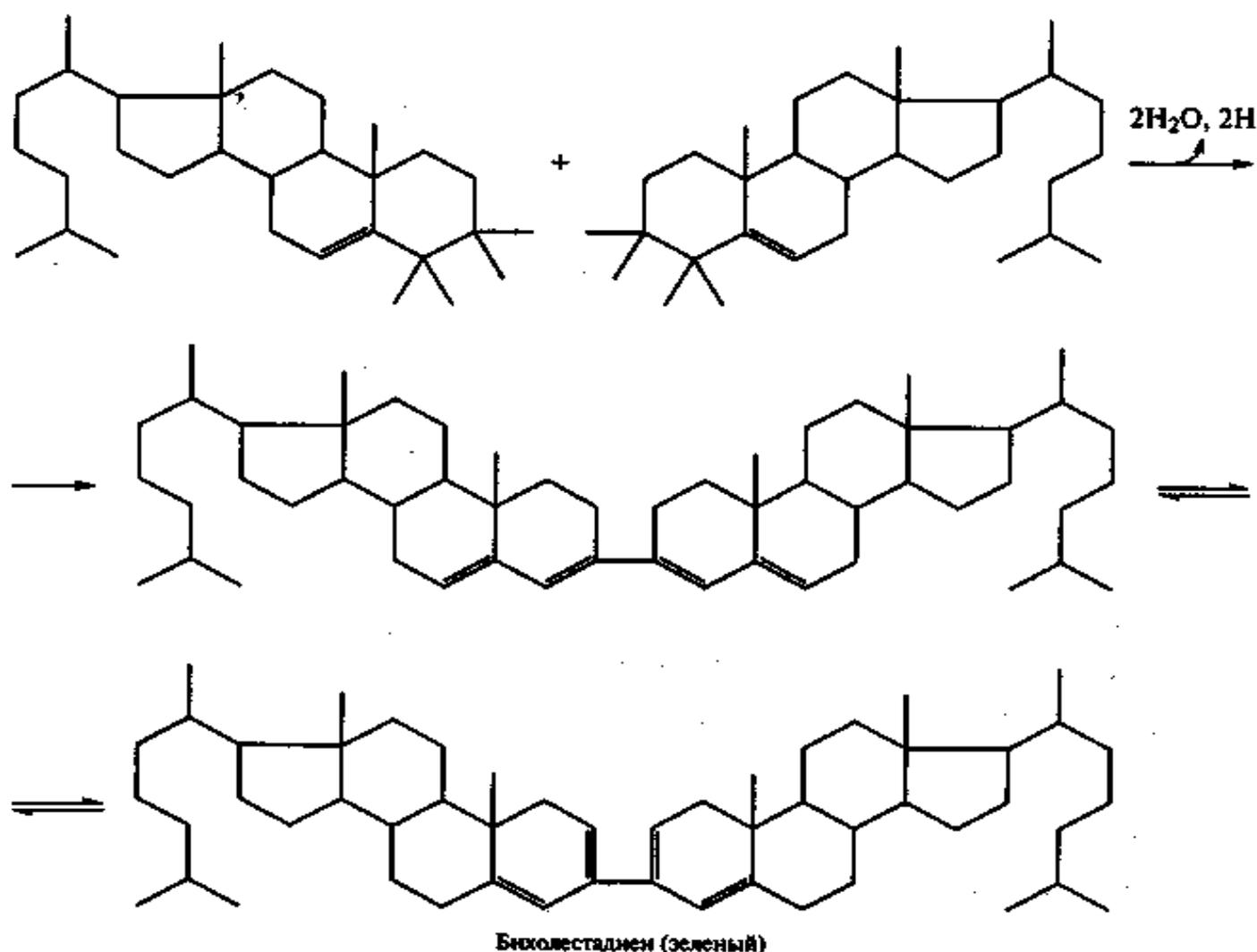
- ♦ Растительное масло.
- ♦ Молочный жир (сливочное масло).
- ♦ Отфильтрованный раствор яичного порошка.
- ♦ 50 %-ные хлороформные растворы продуктов.
- ♦ Серная кислота, концентрированная; пробирки стеклянные мерные.
- ♦ Капельницы стеклянные.

Методика проведения анализа. В пробирки наливают по 1 см³ растворов растительного, сливочного масел и яичного порошка в хлоро-

форме, осторожно по стенке пробирки подслаивают концентрированную серную кислоту и наблюдают образование кольца красного цвета. Делают вывод о присутствии в исследуемых пищевых продуктах холестерина или других видов стерина.

**Реакция с уксусным ангидридом
(реакция Либермана — Бурхарда)**

Под действием серной кислоты может происходить дегидратация и окисление стерина, в результате чего две молекулы, например холестерина, потерявшие 2 молекулы воды, взаимодействуют между собой по третьему атому углерода, образуя вещества с суммарными формулами $C_{54}H_{86}$ и $C_{54}H_{88}$. Эти непредельные углеводороды с сопряженными двойными связями дают различными производные с серной кислотой и уксусным ангидридом.



Материалы, реактивы и оборудование:

- ♦ Растительное масло.

- ♦ Молочный жир (сливочное масло).
- ♦ Отфильтрованный раствор яичного порошка.
- ♦ 50 %-ные хлороформные растворы продуктов.
- ♦ Серная кислота концентрированная.
- ♦ Уксусный ангидрид.
- ♦ Пробирки стеклянные мерные.
- ♦ Капельницы стеклянные.

Методика проведения анализа. К 1...2 см³ хлороформного раствора растительного, сливочного масла и яичного порошка добавляют 10 капель уксусного ангидрида и 2 капли концентрированной серной кислоты. Жидкость хорошо встряхивают и наблюдают образование сначала красной, затем красно-фиолетовой, фиолетовой, аметисто-синей, синей и, наконец, зеленой окраски. При маленькой концентрации холестерина может сразу появиться зеленая окраска. Эта реакция положена в основу количественного определения холестерина.

Свойства и реакции желчных кислот

Желчные кислоты (холевая, дезоксихолевая, литохолевая) по своему строению близки к холестерину, они входят в состав желчи в чистом виде и в виде парных соединений с глицином и таурином.

Качественная реакция на желчные кислоты

Качественная реакция на желчные кислоты основана на том, что эти соединения дают окрашенные соединения красного цвета с оксиметилфурфуролом, образующимся из сахарозы или фруктозы под действием концентрированной серной кислоты.

Материалы, реактивы, оборудование:

- ♦ Желчь, разведенная в 5 раз.
- ♦ Сахароза 5 %-ный раствор.
- ♦ Серная кислота, концентрированная.
- ♦ Пробирки стеклянные мерные.
- ♦ Капельницы стеклянные.

Методика проведения анализа. В пробирку наливают 2...3 см³ раствора желчи, добавляют 5...7 капель 5 %-ного раствора сахарозы и хорошо встряхивают. По стенке осторожно приливают 1 см³ концентрированной серной кислоты. На границе слоев наблюдают красно-оранжевое окрашивание в форме кольца.

Эмульгирующие свойства желчных кислот

Жиры подвергаются гидролитическому расщеплению в тонком кишечнике только в эмульгированном виде. В роли эмульгаторов выступают белки, гидрокарбонаты кишечного и панкреатического соков, в меньшей степени — мыла. Основным эмульгирующим действием обладают желчные кислоты.

Материалы, реактивы, оборудование:

- ♦ Растительное масло.
- ♦ Раствор яичного белка (белок куриного яйца смешивают с 20-кратным объемом воды и отфильтровывают в несколько слоев марли), гидроксид калия, 1 %-ный раствор.
- ♦ Натрий углекислый, 1 %-ный раствор.
- ♦ Желчь; пробирки; капельницы стеклянные.

Методика проведения анализа. В пять пробирок вносят по 3...4 капли растительного масла и по 2...3 см³ дистиллированной воды. Добавляют по 20 капель: в первую пробирку — раствора белка, во вторую — 1 %-ного раствора гидроксида калия, в третью — 1 %-ного раствора натрия углекислого, в четвертую — желчи, в пятую — дистиллированной воды. Содержимое пробирок встряхивают, записывают наблюдения и делают выводы об эмульгирующей способности каждого из эмульгаторов.

Лабораторная работа 11.5

Гидролитическое расщепление жира липазой

Одним из важнейших этапов пищеварения является гидролитическое расщепление жира под действием липазы поджелудочной железы.

Цель работы: освоение метода гидролитического расщепления жира липазой.

В данной работе исследуется скорость реакций расщепления молочного жира с получением кривых процесса его гидролиза без активатора и с активатором фермента липазы (желчью).

Материал, реактивы и оборудование:

- ♦ Измельченная и растертая в ступке поджелудочная железа крупного рогатого скота или свиньи, смешанная с водой при соотношении 1 : 3 и процеженная через марлю в 2...3 слоя.
- ♦ Прокипяченное и охлажденное молоко.
- ♦ Фенолфталеин, 0,1 %-ный спиртовой раствор.

- ♦ Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор.
- ♦ Желчь.
- ♦ Термостат.
- ♦ Конические колбы на 100 см³.
- ♦ Пипетки на 10 см³.
- ♦ Капельницы.
- ♦ Бюретки.

Методика проведения анализа. В две конические колбы на 100 см³ отмеривают по 50 см³ кипяченого молока, после чего добавляют по 2 см³ вытяжки из поджелудочной железы, содержащей липазу. В первую колбу приливают еще по 5 капель желчи для активации липазы.

Содержимое обеих колб быстро перемешивают и тотчас же из каждой отбирают по 10 см³ жидкости для титрования. Колбы с реакционной смесью переносят в термостат, нагретый до 37 °С.

К отобраным 10 см³ жидкости добавляют 10 см³ дистиллированной воды, 2...3 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. Результаты титрования записывают в журнал.

Из колб, помещенных в термостат, через 10...15 мин отбирают по 10 см³ и пробы оттитровывают так же, как описано выше.

Под влиянием липазы происходит гидролитическое расщепление молочного жира, и содержание свободных жирных кислот со временем нарастает. Скорость гидролиза жира выше в той колбе, в которую добавлена желчь.

Результаты опыта отражают на графике. На оси абсцисс откладывают время реакции в минутах, на оси ординат — количество 0,1 н. раствора гидроксида натрия в см³. Вычерчивают кривые, характеризующие кинетику реакции гидролитического расщепления жира, катализируемой липазой, и липазой, активированной желчью.

Контрольные вопросы и задачи

1. В чем заключается сущность переваривания белков в желудочно-кишечном тракте?
2. Какие протеолитические ферменты и в какой последовательности осуществляют гидролитическое расщепление белков при пищеварении?
3. Охарактеризуйте принцип метода определения гидролитического расщепления белков при участии ферментов поджелудочной железы.

4. Какие существуют биологические и химические методы определения качества белка в пищевых продуктах?
5. Как рассчитать аминокислотный скор белков?
6. Дайте сравнительную характеристику качеству растительного и животного белка. Какие факторы влияют на биологическую ценность белка?
7. Охарактеризуйте понятия «пищевая» и «энергетическая ценность» пищевых продуктов. Как рассчитываются данные показатели?
8. Холестерин: химическая природа, содержание в пищевых продуктах и его роль в процессах переваривания пищи.
9. Желчные кислоты: поверхностно-активные свойства и участие в процессах пищеварения.

Приложения

Приложение 1.

Приготовление буферных растворов

Таблица П 1.1

Глицин — HCl буфер (0,05 М), рН 2,2...3,6
Глицин, м.м. = 75,07

рН	0,2 М Глицин, см ³	0,2 М HCl, см ³	H ₂ O, см ³	рН	0,2 М Глицин, см ³	0,2 М HCl, см ³	H ₂ O, см ³
2,2	50	44,0	До 200	3,0	50	11,4	До 200
2,4	50	32,4	То же	3,2	50	8,2	То же
2,6	50	24,2	» »	3,4	50	6,4	» »
2,8	50	16,8	» »	3,6	50	5,0	» »

Таблица П 1.2

Фосфатно-цитратный буфер, рН 2,2...8,0
Na₂HPO₄ · 2H₂O, м.м. = 178,05;
Лимонная кислота · H₂O, м.м. = 210,14

рН	0,2 М Na ₂ HPO ₄ , см ³	0,1 М Лимонная кислота, см ³	рН	0,2 М Na ₂ HPO ₄ , см ³	0,1 М Лимонная кислота, см ³	рН	0,2 М Na ₂ HPO ₄ , см ³	0,1 М Лимонная кислота, см ³
2,2	0,40	19,60	4,2	8,28	11,72	6,2	13,22	6,78
2,4	1,24	18,76	4,4	8,82	11,18	6,4	13,85	6,15
2,6	2,18	17,82	4,6	9,35	10,65	6,6	14,55	5,45
2,8	3,17	16,83	4,8	9,86	10,14	6,8	15,45	4,55
3,0	4,11	15,89	5,0	10,30	9,70	7,0	16,47	3,53
3,2	4,94	15,06	5,2	10,72	9,28	7,2	17,39	2,61
3,4	5,70	14,30	5,4	11,15	8,85	7,4	18,17	1,83
3,6	6,44	13,56	5,6	11,60	8,40	7,6	18,73	1,27
3,8	7,10	12,90	5,8	12,09	7,91	7,8	19,15	0,85
4,0	7,71	12,29	6,0	12,63	7,37	8,0	19,45	0,55

Таблица П 1.3

0,1 М Цитратный буфер, pH 3,0...6,2
 Лимонная кислота · Н₂О, м.м. = 210,14;
 Трехзамещенный цитрат натрия · 2Н₂О, м.м. = 294,12

pH	0,1 М Лимонная кислота, см ³	0,1 М Цитрат натрия трехзамещенный, см ³	pH	0,1 М Лимонная кислота, см ³	0,1 М Цитрат натрия трехзамещенный, см ³
3,0	16,4	3,6	4,8	8,0	12,0
3,2	15,5	4,5	5,0	7,0	13,0
3,4	14,6	5,4	5,2	6,1	13,9
3,6	13,7	6,3	5,4	5,0	14,9
3,8	12,7	7,3	5,6	4,2	15,8
4,0	11,8	8,2	5,8	3,2	16,8
4,2	10,8	9,2	6,0	2,3	17,7
4,4	9,9	10,1	6,2	1,6	18,4
4,6	8,9	11,1			

Таблица П 1.4

0,2 М Ацетатный буфер, pH 3,6...5,8
 Ацетат натрия · 3Н₂О, м.м. = 136,09

pH	0,2 М ацетат натрия, см ³	0,2 М Уксусная кислота, см ³	pH	0,2 М ацетат натрия, см ³	0,2 М Уксусная кислота, см ³	pH	0,2 М ацетат натрия, см ³	0,2 М Уксусная кислота, см ³
3,6	0,75	9,25	4,4	3,70	6,30	5,2	7,90	2,10
3,8	1,20	8,80	4,6	4,90	5,10	5,4	8,60	1,40
4,0	1,80	8,20	4,8	5,90	4,10	5,6	9,10	0,90
4,2	2,65	7,35	5,0	7,00	3,00	5,8	9,40	0,60

Таблица П 1.5

0,1 М Фосфатный буфер, pH 5,8...8,0
 Двухзамещенный фосфат натрия · 2Н₂О, м.м. = 178,05;
 Двухзамещенный фосфат натрия · 12Н₂О, м.м. = 358,22;
 Однозамещенный фосфат натрия · Н₂О, м.м. = 138,00;
 Однозамещенный фосфат натрия · 2Н₂О, м.м. = 156,03

pH	0,2 М Двухзамещенный фосфат натрия, см ³	0,2 М Однозамещенный фосфат натрия, см ³	Н ₂ О, см ³	pH	0,2 М Двухзамещенный фосфат натрия, см ³	0,2 М Однозамещенный фосфат натрия, см ³	Н ₂ О, см ³
5,8	8,0	92,0	До 200	7,0	61,0	39,0	До 200
6,0	12,3	87,7	То же	7,2	72,0	28,0	То же
6,2	18,5	81,5	» »	7,4	81,0	19,0	» »
6,4	26,5	73,5	» »	7,6	87,0	13,0	» »
6,6	37,5	62,5	» »	7,8	91,5	8,5	» »
6,8	49,0	51,0	» »	8,0	94,7	5,3	» »

Таблица П 1.6

0,05 М Фосфатный буфер, рН 5,8...8,0
 Однозамещенный фосфат калия, м.м. = 136,09

рН	0,2 М Однозамещенный фосфат калия, см ³	0,2 М Натриевая или калиевая щелочь, см ³	Н ₂ О, см ³	рН	0,2 М Однозамещенный фосфат калия, см ³	0,2 М Натриевая или калиевая щелочь, см ³	Н ₂ О, см ³
5,8	5,0	0,36	До 20	7,0	5,0	2,91	До 20
6,0	5,0	0,56	То же	7,2	5,0	3,47	То же
6,2	5,0	0,81	» »	7,4	5,0	3,91	» »
6,4	5,0	1,16	» »	7,6	5,0	4,24	» »
6,6	5,0	1,64	» »	7,8	5,0	4,25	» »
6,8	5,0	2,24	» »	8,0	5,0	4,61	» »

Таблица П 1.7

0,05 М Трис-буфер, рН 7,2...9,1
 Трис м.м. = 121,14

рН		0,2 М Трис, см ³	0,1 М НСl, см ³	Н ₂ О, см ³	рН		0,2 М Трис, см ³	0,1 М НСl, см ³	Н ₂ О, см ³
23 °С	37 °С				23 °С	37 °С			
9,10	8,95	25	5,0	До 100	8,05	7,90	25	27,5	До 100
8,92	8,78	25	7,5	То же	7,96	7,82	25	30,0	То же
8,74	8,60	25	10,0	» »	7,77	7,73	25	32,5	» »
8,62	8,48	25	12,5	» »	7,87	7,63	25	35,0	» »
8,50	8,37	25	15,0	» »	7,66	7,52	25	37,5	» »
8,40	8,27	25	17,5	» »	7,54	7,40	25	40,0	» »
8,32	8,18	25	20,0	» »	7,36	7,22	25	42,5	» »
8,23	8,10	25	22,5	» »	7,20	7,05	25	54,0	» »
8,14	8,00	25	25,0	» »					

Таблица П 1.8

0,2 М Боратный буфер, рН 7,4...9,0
 Бура (Na₂B₄O₇ · 2H₂O), м.м. = 381,43
 Борная кислота, м.м. = 61,84

рН	0,05 М Бура, см ³	0,2 М Борная кислота, см ³	рН	0,05 М Бура, см ³	0,2 М Борная кислота, см ³	рН	0,05 М Бура, см ³	0,2 М Борная кислота, см ³
7,4	1,0	9,0	8,0	3,0	7,0	8,7	6,0	4,0
7,6	1,5	8,5	8,2	3,5	6,5	9,0	8,0	2,0
7,8	2,0	8,0	8,4	4,5	5,5			

Таблица П 1.9

0,05 М Боратный буфер, рН 9,3...10,1

Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), м.м. = 381,43

рН	0,05 М Бура, см ³	0,2 М Натриевая щелочь, см ³	H ₂ O, см ³	рН	0,05 М Бура, см ³	0,2 М Натриевая щелочь, см ³	H ₂ O, см ³
9,3	50	0,0	До 200	9,8	50	34,0	До 200
9,4	50	11,0	То же	10,0	50	43,0	То же
9,6	50	23,0	» »	10,1	50	46,0	» »

Таблица П 1.10

0,05 М Глицериновый буфер, рН 8,6...10,6

Глицин, м.м. = 75,07

рН	0,2 М Глицин, см ³	0,2 М Натриевая щелочь, см ³	H ₂ O, см ³	рН	0,2 М Глицин, см ³	0,2 М Натриевая щелочь, см ³	H ₂ O, см ³
8,6	50	4,0	До 200	9,6	50	22,4	» »
8,8	50	6,0	То же	9,8	50	27,2	» »
9,0	50	8,8	» »	10,0	50	32,0	» »
9,2	50	12,0	» »	10,4	50	38,6	» »
9,4	50	16,8	» »	10,6	50	45,5	» »

Плотности и концентрации растворов некоторых кислот

Таблица П 2.1

Раствор соляной кислоты

Плотность при 20 °С, г/см ³	Концентрация HCl		Плотность при 20 °С, г/см ³	Концентрация HCl	
	г/100 г раствора (вес.%)	моль/л		г/100 г раствора (вес.%)	моль/л
1,100	20,39	6,150	1,170	34,18	10,970
1,110	22,33	6,796	1,180	36,23	11,730
1,120	24,25	7,449	1,185	37,27	12,110
1,130	26,20	8,118	1,190	38,32	12,500
1,140	28,18	8,809	1,195	39,37	12,900
1,150	30,14	9,505	1,198	40,00	13,140
1,160	32,14	10,225			

Таблица П 2.2

Раствор серной кислоты

Плотность при 20 °С, г/см ³	Концентрация H ₂ SO ₄		Плотность при 20 °С, г/см ³	Концентрация H ₂ SO ₄	
	г/100 г раствора (вес.%)	моль/л		г/100 г раствора (вес.%)	моль/л
1,100	14,73	1,652	1,810	89,23	16,460
1,200	27,72	3,391	1,820	91,11	16,910
1,300	39,68	5,259	1,830	93,64	17,470
1,400	50,50	7,208	1,831	93,94	17,540
1,500	60,17	9,202	1,832	94,32	17,620
1,600	69,09	11,270	1,833	94,72	17,700
1,700	77,63	13,460	1,834	95,12	17,790
1,800	87,69	16,090	1,835	95,72	17,910

Таблица П 2.3

Раствор хлорной кислоты

Плотность при 20 °С, г/см ³	Концентрация HClO ₄		Плотность при 20 °С, г/см ³	Концентрация HClO ₄	
	г/100 г раствора (вес.%)	моль/л		г/100 г раствора (вес.%)	моль/л
1,005	1,00	0,1004	1,205	29,86	3,582
1,030	5,25	0,5383	1,300	40,10	5,189
1,060	10,06	1,061	1,410	50,10	7,032
1,095	15,28	1,665	1,540	60,04	9,203
1,130	20,26	2,279	1,675	70,15	11,700
1,165	24,94	2,892			

Таблица П 2.4

Раствор уксусной кислоты

Плотность при 20 °С, г/см ³	Концентрация CH ₃ COOH		Плотность при 20 °С, г/см ³	Концентрация CH ₃ COOH	
	г/100 г раствора (вес.%)	моль/л		г/100 г раствора (вес.%)	моль/л
1,000	1,20	0,200	1,050	40,20	7,080
1,005	4,64	0,777	1,055	46,90	8,240
1,010	8,14	1,370	1,060	53,40	9,430
1,015	11,70	1,980	1,065	61,40	10,900
1,020	15,40	2,610	1,070	77...79 ¹⁾	13,7...14,1
1,025	19,20	3,270	1,075	91,20	16,200
1,030	23,10	3,960	1,080	95,40	16,800
1,035	27,20	4,680	1,085	98,00	17,200
1,040	31,60	5,460	1,090	99,90	17,500
1,045	36,20	6,300			

¹⁾ Уксусная кислота в указанных границах концентраций имеет плотность 1,0700 г/см³ с отклонениями меньше 0,0001. Поскольку дальнейшее повышение концентрации приводит снова к уменьшению плотности, для установления, какая из двух возможных концентраций соответствует найденной плотности, приливают к пробе немного воды. Если плотность уменьшается, надо взять меньшую, если увеличивается, то берут большую концентрацию.

Индикаторы, наиболее часто применяемые на практике

Таблица П 3.1

Характеристики наиболее часто применяемых индикаторов

Наименование	pK	Интервал перехода окраски pH	Окраска в среде		Кон- центра- ция, %	Растворитель
			кислой	щелочной		
Кристалл- фиолетовый		0,0...2,0	Зеленая	Фиоле- товая	—	Вода
Тимоловый синий (1-й пе- реход)	1,7	1,2...2,8	Красная	Желтая	0,1	А. 20° спирт, Б. Вода с добав- лением 4,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Крезоловый красный (1-й переход)		0,9...1,8	Красная	Желтая	0,1	А. 20° спирт, Б. Вода с добав- лением 5,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Метиловый желтый		2,9...4,0	Красная	Желтая	0,1 и 0,01	90° спирт
Бромфено- ловый спирт	3,87	3,0...4,6	Желтая	Синяя	0,1	А. 20° спирт, Б. Вода с добав- лением 3,0 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Метиловый оранжевый	3,5	3,1...4,4	Красная	Оран- жевая	0,1	Вода
Бромкрезо- ловый синий (бромкрезоло- вый зеленый)		3,8...5,4	Желтая	Синяя	0,1	А. 200 спирт, Б. Вода с добав- лением 2,9 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Конго рот		3,0...5,2	Синяя	Красная		

Таблица П3.1 (продолжение)
 Характеристики наиболее часто применяемых индикаторов

Наименование	pK	Интервал перехода окраски pH	Окраска в среде		Концентрация, %	Растворитель
			кислой	щелочной		
Лакмус		5,0...8,0	Красная	Синяя		
Метиловый красный	5,0	4,4...6,2	Красная	Желтая	0,1 и 0,2	60° спирт
Бромтимоловый синий	7,0	6,0...7,6	Желтая	Синяя	0,05	А. 20° спирт, Б. Вода с добавлением 3,2 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Нейтральный красный		6,8...8,0	Красная	Янтарно-желтая	0,1	60° спирт
Феноловый	7,8	6,8...8,0	Желтая	Красная	0,1	А. 20° спирт, Б. Вода с добавлением 5,7 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Крезоловый красный (2-й переход)		7,2...8,8	Янтарно-желтая	Пурпурно-красная	0,1	А. 20° спирт, Б. Вода с добавлением 5,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Тимоловый синий	8,9	8,0...9,6	Желтая	Синяя	0,1	А. 20° спирт, Б. Вода с добавлением 4,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Фенолфталеин	9,7	8,2...10,0	Бесцветная	Пурпурная	0,1 и 1,0	60° спирт
Тимолфталеин		9,3...10,5	Бесцветная	Синяя	0,1	90° спирт
Ализаровый желтый		10,1...12,1	Желтая	Оранжевая	0,1	Вода

Универсальные индикаторы

I. 0,1 г бромтимолового синего, 0,1 г метилового красного, 0,1 г нафтофталеина, 1,0 г фенолфталеина растворяют в 500 см³ 70 % этилового спирта.

II. 0,1 г фенолфталеина, 0,05 г тимолового синего, 0,3 г метилового желтого, 0,2 г метилового красного, 0,4 г бромтимолового синего растворяют в 500 см³ 70 % этилового спирта.

III. 0,04 г метилового оранжевого, 0,02 г метилового красного, 0,12 г нафтофталеина растворяют в 100 см³ 70 % этилового спирта.

Таблица П4.1

Изменение окраски универсальных индикаторов

pH	Окраска индикатора		
	I	II	III
4	Красная	Оранжевая	Бледно-розовая
5	Оранжевая	Оранжево-желтая	Оранжевая
6	Желтая	Желтая	—
7	Зелено-желтая	—	Желто-зеленая
8	Зеленая	Зеленая	Темно-зеленая
10	Сине-фиолетовая	Синяя	Фиолетовая

Приготовление некоторых реактивов

1. Реактив Шомадьи

Реактив Шомадьи состоит из двух растворов.

1-й раствор: 24 г карбоната натрия и 12 г тартрата калия — натрия (калий натрий виннокислый средний) помещают в коническую колбу вместимостью 500 см³ и добавляют 250 см³ дистиллированной воды.

Затем приливают 40 см³ 10 % раствора сульфата меди, перемешивают и добавляют 16 г гидрокарбоната натрия.

2-й раствор: 18 г Na₂SO₄ растворяют в 500 см³ горячей дистиллированной воды. Раствор кипятят в течение 40 минут для удаления CO₂, затем охлаждают.

Оба раствора смешивают в мерной колбе на 1 дм³, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. В течение первых двух-трех суток хранения реактива Шомодьи оседает небольшое количество меди с примесями. Этот осадок отфильтровывают, готовый раствор хранят в темной склянке.

2. Реактив Нельсона

25 г модибдата аммония помещают в мерную колбу на 500 см³ и растворяют в 150 см³ H₂O. Раствор перемешивают, к нему осторожно небольшими порциями добавляют 21 см³ концентрированной H₂SO₄ (х. ч.) при непрерывном перемешивании.

3 г гептагидрата гидроортоарсената натрия (Na₂HAsO₄ · 7H₂O) растворяют отдельно в химическом стаканчике в 50 см³ H₂O и приливают к приготовленному ранее раствору в мерную колбу.

Получается прозрачный раствор светло-желтого цвета, его доводят до метки водой и выдерживают в термостате при 37 °С в течение 2 суток. После выдержки раствор готов к употреблению.

3. Реактив Фолина — Чокальтеу

100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ помещают в круглодонную колбу и растворяют в 700 воды, прибавляют 50 см^3 85 %-ной H_3PO_4 и 100 см^3 концентрированной HCl . Смесь кипятят с обратным холодильником 10 часов, затем добавляют 150 г Li_2SO_4 , 50 см^3 воды и несколько капель брома. Для удаления избытка брома смесь кипятят без холодильника. После охлаждения раствор доводят водой до литра, фильтруют и хранят в темной склянке. Реактив Фолина титруют 0,1 н. NaOH до перехода окраски по фенолфталеину и разбавляют водой из такого расчета, чтобы раствор имел 1 н. кислотность (для этого реактив разбавляется примерно в 2 раза).

4. Основной раствор йода

0,5 г металлического йода взвешивают в бюксе с пришлифованной крышкой. К нему добавляют 5 г KI , растворяют в небольшом количестве воды ($5 \dots 10 \text{ см}^3$). Затем переносят в мерную колбу на 200 см^3 и доводят объем до метки.

Хранят в темной склянке не более 30 суток со дня приготовления.

5. Рабочий раствор йода

Рабочий раствор йода готовят непосредственно перед началом анализа. 2 см^3 основного раствора йода разводят в мерной колбе на 100 см^3 0,1 н. раствором HCl .

6. Антроновый реактив

200 мг антрона растворяют в 100 см^3 концентрированной серной кислоты (плотность 1,84).

Характеристика различных марок сефадексов

Таблица 11.10

Характеристика различных марок сефадексов

Тип сефадекса	Размер частиц, микроны	Число набухания, г на 1 г сухого сефадекса	Объем геля, см ³ на 1 г сухого сефадекса	Минимальное время набухания, ч		Фракционирование пептидов и белков с молекулярной массой, Да
				при комнатной температуре	на кипящей водяной бане	
G-10	40...120	1,0...0,1	2,0...3,0	3	1	До 700
G-15	40...120	1,5...0,2	2,5...3,5	3	1	До 1500
G-25 (средний)	50...150	2,5...0,2	4,0...6,0	3	1	1000...5000
G-50 (средний)	50...150	5,0...0,3	9,0...11,0	3	1	1500...30000
G-75 (средний)	40...120	7,5...0,5	12,0...15,0	24	3	3000...70000
G-100 (средний)	40...120	10,0...1,0	15,0...20,0	72	5	4000...150000
G-150 (средний)	40...120	15,0...1,5	20,0...30,0	72	5	5000...400000
G-200 (средний)	40...120	20,0...2,0	30,0...40,0	72	5	5000...800000

**Соотношение между содержанием сахаров в растворе
и количеством восстановленной меди**

Таблица П8.1
Соотношение между содержанием сахаров в растворе и количеством
восстановленной меди (в мг)

Количество сахара	Восстановлено меди под действием		Количество сахара	Восстановлено меди под действием		Количество сахара	Восстановлено меди под действием	
	глюкозы	инвертного сахара		глюкозы	инвертного сахара		глюкозы	инвертного сахара
10	20,4	20,6	40	77,5	77,7	70	129,8	129,2
11	22,4	22,6	41	79,3	79,5	71	131,4	130,8
12	24,3	24,6	42	81,1	81,2	72	133,1	132,4
13	26,3	26,5	43	82,9	83	73	134,7	134
14	28,3	28,5	44	84,7	84,8	74	136,3	135,6
15	30,2	30,5	45	86,4	86,5	75	137,9	137,2
16	34,2	32,5	46	88,2	88,3	76	139,6	138,9
17	36,2	34,5	47	90	90,1	77	141,2	140,6
18	36,4	36,4	48	91,8	91,9	78	142,8	142,1
19	38,1	38,1	49	93,6	93,6	79	144,5	143,7
20	40,1	40,4	50	95,4	95,4	80	146,1	145,3
21	42	42,3	51	97,1	97,1	81	147,7	146,9
22	43,9	44,2	52	98,9	98,8	82	149,3	148,5
23	45,8	46,1	53	100,6	100,6	83	150,9	150
24	47,7	48	54	102,3	102,3	84	152,5	151,6
25	49,6	49,8	55	104,1	104	85	154	153,2
26	51,5	51,7	56	105,8	105,7	86	155,6	154,8
27	53,4	53,6	57	107,7	107,4	87	157,2	156,4
28	55,3	55,5	58	109,3	109,2	88	158,8	157,9
29	57,2	57,4	59	111,1	110,9	89	160,4	159,5
30	59,1	59,3	60	112,8	112,6	90	162	161,1
31	60,9	61,1	61	114,5	114,3	91	163,6	162,6
32	62,8	63	62	116,2	115,9	92	165,2	164,2
33	64,6	64,8	63	117,9	117,6	93	166,7	165,7
34	66,5	66,7	64	119,6	119,2	94	169,3	167,3
35	68,3	68,5	65	121,3	120,9	95	169,9	168,8
36	70,1	70,3	66	123	122,6	96	171,5	170,3
37	72	72,2	67	124,7	124,2	97	173,1	171,9
38	73,8	74	68	126,4	125,9	98	174,6	173,4
39	75,7	75,9	69	128,1	127,5	99	176,2	175
						100	177,8	176,5

Предельно-допустимые концентрации (ПДК)

Таблица 11.11

Предельно-допустимые концентрации тяжелых металлов в некоторых пищевых продуктах (мг/кг)

Продукт	Медь	Свинец	Кадмий	Цинк
Зерновые	10	0,5	0,1	50
Хлеб	5	0,3	0,05	25
Конфеты	15	1,0	0,1	30
Печенье	10	0,5	0,1	30
Овощи	5	0,5	0,03	10
Пиво, вино	5	0,3	0,03	10

Таблица 11.12

Предельно-допустимые концентрации (ПДК) содержания нитратов в продуктах растениеводства

Продукт	Концентрация	Продукт	Концентрация
Картофель	250	Свекла	1400
Капуста	500	Салат	2000
Морковь	250	Яблоки	60

Содержание калия, натрия, кальция в некоторых пищевых продуктах

Таблица 11.13

Содержание калия, натрия, кальция в некоторых пищевых продуктах

Продукт	Влаж-ность, %	Содержание, мг/100 продукта		
		калия	натрия	кальция
Капуста белокачанная	90	185	13	48
Картофель	75	568	28	10
Морковь	83,5	200	21	51
Свекла	86,5	288	86	37
Яблоки	86,5	248	26	16
Хлеб ржано-пшеничный	46,9	195	589	37
Хлеб пшеничный	36,3	125	402	25
Вино «Портвейн»	78	150	15	15
Вино «Десертное»	70	160	17	20

Литература

1. Практикум по биохимии: Учебное пособие. / Под ред. С. Е. Северена, Г. А. Соловьевой. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — 509 с.
2. Ермолаева Г. А. Справочник работника пивоваренного предприятия. — СПб.: Профессия, 2004. — 536 с.
3. Ермаков А. И., Арасимович В. Е. и др. Методы биохимического исследования растений (под ред. А. И. Ермакова). — Л.: Колос, 1972. — 456 с.
4. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии (под общей ред. акад. С. Е. Северена). — М.: Высшая школа, 1971. — 352 с.
5. Грачева И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
6. Виноградова А. А., Мелькина, Г. М., Фомичева Л. А., Шебершнева Н. Н., Шуб И. С., Шикина В. С. (под ред. Л. П. Ковальской). — М.: Агропромиздат, 1991. — 335 с.

Углеводы

7. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов. / Под ред. Скурихина И. М., Тутельяна В. А. — М.: Брандес, Медицина, 1998. — 341 с.
8. А. П. Нечаев, С. Е. Траубенберг, И. С. Витол и др. Руководство к лабораторным занятиям по пищевой химии: пособие для вузов. — М., МГУПП, 2002. — 194 с.

Минеральные вещества

9. Осташенкова Н. В., Кобелева И. Б., Штерман В. С., Андреевская О. В. Методические указания к выполнению лабораторных работ по элективному курсу «Современные методы анализа минерального состава продовольственного сырья и пищевых продуктов». — М., МГУПП. — 1998. — 45 с.

Вода

10. Фомин Г. С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. — М., Госстандарт России, изд. «Протектор», 2000. — 838 с.

Основы питания и пищеварения

11. Мартинчик А. Н., Маев И. В., Петухов А. Б. Питание человека (Основы нутрициологии). Под ред. А. Н. Мартинчика. — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. — 576 с.
12. Пищевая химия / Нечаев А. П., Траубенберг С. Е., Кочеткова А. А. и др. Под ред. А. П. Нечаева. Издание 3-е, испр. — СПб: ГИОРД, 2004. — 640 с.
13. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник / Под ред. И. М. Скурихина и В. А. Тутельяна. — М.: ДеЛи принт, 2002. — 236 с.

14. Химический состав блюд и кулинарных изделий. Справочные таблицы содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности блюд и кулинарных изделий: В 2-х т. / Под ред. И. М. Скурихина и М. Н. Волгарева. Т. 1. — М. 1994. — 205 с.
15. Арутюнян И. С., Корнена Е. П. и др. Лабораторный практикум по химии жиров. — СПб.: ГИОРД, 2004. — 262 с.
16. Ауэрман Т. Л., Попов М. П. / Под ред. В. Л. Кретовича). — М.: Изд-во МТИПП, 1973. — 169 с.
17. Грачева И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
18. Ермаков А. И., Арасимович В. Е. и др. Методы биохимического исследования растений (под ред. А. И. Ермакова). — Л.: Колос, 1972. — 456 с.
19. Ермолаева Г. А. Справочник работника пивоваренного предприятия. — СПб.: Профессия, 2004. — 536 с.
20. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
21. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии (Под общей ред. акад. С. Е. Северена). — М.: Высшая школа, 1971. — 352 с.
22. Мартинчик А. Н., Маев И. В., Петухов А. Б. Питание человека (Основы нутрициологии). Под ред. А. Н. Мартинчика. — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. — 576 с.
23. Осташенкова Н. В., Кобелева И. Б., Штерман В. С., Андриевская О. В. Методические указания к выполнению лабораторных работ по курсу «Современные методы анализа минерального состава продовольственного сырья и пищевых продуктов». — М.: МГУПП, 1998. — 45 с.
24. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов. Под ред. Скурихина И. М., Тутельяна В. А. — М.: Брандес — Медицина, 1998. — 342 с.
25. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03. — М.: Минздрав России, 2004. — 240 с.
26. Руководство по методам исследования, теххимическому контролю и учету производства в масложировой промышленности. / Под ред. Ржехина В. П. и Сергеева А. Г. Т. I. Книга первая. — Л.: ВНИИЖ, 1967. — 585 с.
27. Спиричев В. Б., Шатнюк Л. Н., Бозняковский В. М. Обогащение пищевых продуктов витаминами и минеральными веществами. Наука и технология. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2004. — 548 с.
28. Фомин Г. С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. — М.: Госстандарт России, изд. «Протектор», 2000. — 838 с.
29. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник / Под ред. И. М. Скурихина и В. А. Тутельяна. — М.: ДеЛи-принт, 2002. — 236 с.
30. Экспериментальная витаминология. Под ред. Островского Ю. М. — Минск: Наука и техника, 1979. — 552 с.

КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА **ГИОРД**

- + Биотехнология: Учеб. / И. В. Тихонов, Е. А. Рубан, Т. Н. Грязнева и др. – 2005
- + Биохимия: Учеб. для вузов. 3-е изд., испр. и доп. / В. Г. Щербаков и др. – 2005
- + Виноградов Ю. Н. и др. Проектирование предприятий мясомолочной отрасли и рыбообрабатывающих производств: Теоретические основы общестроительного проектирования: Уч. пос. для вузов. – 2005
- + Гавриленков А. М. и др. Экологическая безопасность пищевых производств: Уч. пос. для вузов. – 2005
- + Нилова Л. П. Товароведная оценка и экспертиза зерна и продуктов его переработки: Учеб. для вузов. – 2005
- + Горбатова К. К. Химия и физика молока: Учеб. для вузов. – 2004
- + Закревский В. В. Безопасность пищевых продуктов. БАД и ГМИ: Уч. пос. для вузов. – 2004
- + Илюхин В. В., Тамбовцев И. М. Монтаж, наладка, диагностика и ремонт технологического оборудования мясоперерабатывающих производств: Уч. пос. для вузов. – 2005
- + Карпиленко Г. П., Казаков Б. Д. Биохимия зерна и хлебопродуктов: Учеб. для вузов. – 2004
- + Константинова Л. Л., Дубровин С. Ю. Сырье рыбной промышленности: Учебное пособие для вузов. – 2005
- + Косой В. Д. и др. Инженерная реология биотехнологических сред: Уч. пос. для вузов. – 2005
- + Кошевой Е. П. Практикум по расчетам технологического оборудования пищевых производств. – 2005
- + Лабораторный практикум по химии жиров / Н. С. Арутюнян и др. – 2-е изд. – 2004
- + Медведев Г. М. Технология макаронных изделий (Учеб. для вузов). – 2005
- + Нечаев А. П. и др. Пищевая химия: Учеб. для вузов. – 3-е изд., 2004
- + Олейникова А. Я. и др. Практикум по технологии кондитерских изделий. – 2005
- + Охрименко О. В., Горбатова К. К., Охрименко А. В. Лабораторный практикум по химии и физике молока. – 2005
- + Перетрухина А. Т., Перетрухина И. В. Микробиология сырья и продуктов водного происхождения: Уч. для вузов. – 2005
- + Пучкова Л. И. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства: Уч. пос. для вузов. – 2004
- + Пучкова Л. И. и др. Технология хлеба (Учеб. для вузов). – 2005
- + Технология рыбы и рыбных продуктов: Учеб. для вузов / В. В. Баранов, И. Э. Бражная, В. А. Гроховский и др.; Под ред. А. М. Ершова. – 2006

Эти книги, а также около 300 других книг по пищевой промышленности вы можете заказать по адресу:

192148, Санкт-Петербург, ул. Б. Звонкая, 23
ЗАО «Торговый Дом ГИОРД»

Тел./факс:
(812) 449-92-20
(495) 789-46-58

e-mail:
gord@giord.com

Internet:
www.publishing-giord.com

