

КУРС ЛЕКЦИЙ

МОЛЧАНОВА АЛЛА ИВАНОВНА

Методическое пособие для студентов

ПИЩЕВАЯ ХИМИЯ



Ростов-на-Дону
2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РАБОТЫ.....	8
Тема 1. БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА	10
1.1. Выделение и очистка белков	15
1.2. Методы определения содержания белка и аминокислот ..	16
1.2.1. Определение общего азота по методу Кьельдаля.....	16
1.2.2. Определение белка по методу Лоури.....	19
1.2.3. Определение аминного азота методом формольного титрования.....	20
1.3. Методы фракционирования белков	21
1.3.1. Метод гель-хроматографии.....	22
1.3.2. Метод ионообменной хроматографии.....	25
1.3.3. Электрофоретическое разделение белков.....	26
1.3.4. Изоэлектрическое фокусирование белков.....	26
1.4. Лабораторные работы	27
Лабораторная работа 1.4.1 Построение калибровочной кривой для определения белка по методу Лоури.....	27
Лабораторная работа 1.4.2. Экстракция и осаждение белков...	29
Лабораторная работа 1.4.3. Фракционирование белков различной природы по растворимости.....	33
Лабораторная работа 1.4.4. Калибровка колонки с сефадексом G-50.....	37
Лабораторная работа 1.4.5. Фракционирование веществ методом гель-хроматографии через сефадекс.....	39
Лабораторная работа 1.4.6. Методы оценки качества белка и биологической ценности пищевых продуктов.....	42
Контрольные вопросы	48
Тестовые задания	49
Тема 2. ЛИПИДЫ	51
2.1. Методы выделения и определения липидов	53
2.1.1. Определение общего содержания липидов методом экстракции смесью Фолча.....	53
2.1.2. Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов методом экстракции по Блайя-Дайеру.....	54
2.1.3. Определение массовой доли «общих» (суммарных) липидов с использованием фильтрующей делительной воронки	56

2.1.4. Определение массовой доли «свободных» липидов методом экстракции на аппарате Сокслета.....	57
2.2. Анализ группового и жирнокислотного состава липидов.....	58
2.3. Лабораторные работы.....	59
Лабораторная работа 2.3.1. Экстракция липидов из пищевого объекта и определение их группового состава.....	59
Лабораторная работа 2.3.2. Исследование физико-химических характеристик пищевых жиров.....	63
Лабораторная работа 2.3.3. Определение биологической эффективности липидов пищевых продуктов.....	72
Контрольные вопросы.....	75
Тестовые задания.....	75
Тема 3. УГЛЕВОДЫ.....	78
3.1. Лабораторные работы.....	81
Лабораторная работа 3.1.1. Определение содержания общего сахара в продуктах кондитерского производства.....	81
Лабораторная работа 3.1.2. Кислотный гидролиз крахмала и идентификация продуктов гидролиза.....	85
Лабораторная работа 3.1.3. Выделение пектина и исследование его свойств.....	87
Контрольные вопросы.....	91
Тестовые задания.....	91
Тема 4. ВИТАМИНЫ.....	93
4.1. Общие сведения.....	93
4.2. Лабораторные работы.....	95
Лабораторная работа 4.2.1. Жирорастворимые витамины. Определение массовой доли β -каротина.....	95
Контрольные вопросы.....	98
Тестовые задания.....	98
Тема 5. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА.....	100
5.1. Лабораторные работы.....	102
Лабораторная работа 5.1.1. Определение содержания ионов кальция в соках, виноматериалах и винах.....	102
Контрольные вопросы.....	103
Тестовые задания.....	103
Тема 6. ФЕРМЕНТЫ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ.....	105
6.1. Методы определения активности ферментов.....	107

6.2. Лабораторные работы.....	108
Лабораторная работа 6.2.1. Определение активности алкогольдегидрогеназы.....	108
Лабораторная работа 6.2.2. Определение активности липоксигеназы по модифицированному методу Г.Г. Дубцова и М.П. Попова.....	109
Контрольные вопросы.....	110
Тестовые задания.....	111
Тема 7. ВОДА.....	112
7.1. Свойства воды.....	113
7.2. Кластерная структура воды.....	120
7.3. Водные растворы.....	122
7.4 Методы определения влаги.....	123
7.5. Лабораторные работы.....	123
Лабораторная работа 7.5.1. Определение активности воды в кондитерских изделиях.....	123
Контрольные вопросы.....	126
Тестовые задания.....	126
Тема 8. ПИЩЕВЫЕ КИСЛОТЫ.....	128
8.1. Газохроматографическое определение отдельных органических кислот.....	130
8.2. Лабораторные работы.....	134
Лабораторная работа 8.2.1. Исследование кислотного состава сухофруктов.....	134
Лабораторная работа 8.2.2. Газохроматографическое определение молочной кислоты в молочных продуктах.....	136
Контрольные вопросы.....	138
Тестовые задания.....	139
Тема 9. ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ.....	140
9.1. Лабораторные работы.....	141
Лабораторная работа 9.1.1. Определение содержания нитратов и нитритов в продовольственном сырье и пищевых продуктах.....	141
Лабораторная работа 9.1.2. Определение нитритов в колбасных изделиях.....	149
Контрольные вопросы.....	152
Тестовые задания.....	152

Тема 10. БЕЗОПАСНОСТЬ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	154
10.1. Методы анализа показателей безопасности пищевых продуктов	154
10.1.1. Методы определения микотоксинов.....	154
10.1.2. Методы определения нитратов, нитритов, N-нитрозоаминов.....	156
10.1.3. Методы определения насыщенных и ароматических углеводов.....	157
10.1.4. Методы определения тяжелых металлов.....	157
10.1.5. Количественный полярографический анализ.....	162
10.2. Лабораторные работы	163
Лабораторная работа 10.2.1. Определение тяжелых металлов в пищевом сырье и пищевых продуктах методом переменного тока полярографии.....	163
Контрольные вопросы	166
Тестовые задания	167
Тема 11. ПИЩЕВАЯ ЦЕННОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ...	168
11.1. Лабораторная работа. Составление карты пищевой и энергетической ценности пищевых продуктов.....	171
Контрольные вопросы	174
Тестовые задания	174
Тема 12. ОСНОВЫ ПИТАНИЯ И ПИЩЕВАРЕНИЯ	177
12.1. Лабораторные работы	179
Лабораторная работа 12.1.1. Гидролитическое расщепление белка ферментами поджелудочной железы.....	179
Лабораторная работа 12.1.2. Гидролитическое расщепление жира липазой.....	182
Контрольные вопросы	183
Тестовые задания	184
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	188
ПРИЛОЖЕНИЯ	190

ВВЕДЕНИЕ

Пищевая химия является одной из ведущих дисциплин, знания которых необходимы для понимания всех сложных процессов, протекающих в пищевой системе, начиная от исследования химического состава пищевого сырья до получения из него готового продукта 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, pH среды, давления и т.д. Понимание этих процессов требует в первую очередь знания структуры и свойств макронутриентов: белков, липидов, углеводов. 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 каждой из этих компонентов, особенностей превращений, методов их анализа дает возможность инженеру-технологу квалифицированно управлять технологическим процессом и получать безопасные пищевые продукты, отвечающие требованиям науки о питании.

В пособии представлены лабораторные работы по основным темам курса «Пищевая химия», составленные согласно стандарту ГОС ВПО. Каждый основной раздел «Пищевой химии» предусматривает не только качественное, но и количественное исследование содержания веществ в продуктах питания.

Выполнение лабораторных работ позволит студентам углубить и закрепить знания, полученные в лекционном курсе и во время самостоятельной работы с литературой, а также обеспечит владение методами проведения исследований.

После каждого раздела представлены контрольные вопросы, обуславливающие закрепление как практических, так и теоретических навыков. В основных для изучения тематических разделах пособия представлены также тестовые задания для самостоятельной работы студентов. Используемые в пособии схемы, структурные формулы и уравнения химических реакций способствуют лучшему восприятию практического материала.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РАБОТЫ

1. Порядок оформления отчетов

По каждой лабораторной работе студент должен составить отчет, в котором необходимо привести:

- цель работы;
- сущность работы;
- ход анализа;
- необходимые расчеты;
- выводы по результатам работы.

Выполнение лабораторных работ должно проводиться строго в соответствии с методикой.

Каждая выполненная работа должна быть защищена студентом.

2. Основные правила безопасной работы в химической лаборатории

При всех работах должна соблюдаться максимальная осторожность.

Нельзя проводить опыты без предварительной проверки исправности электроприборов, целостности и чистоты используемой химической посуды.

Нельзя оставлять без присмотра включенные электроприборы, лабораторные установки.

Внимательно читать надписи на склянках с приготовленными для работы растворами и не оставлять без надписи промежуточные образцы (растворы в колбах, твердые остатки на фильтрах и т.д.).

Все работы, связанные с легколетучими веществами, концентрированными кислотами и щелочами, проводить в вытяжном шкафу.

Отработанные растворы кислот и щелочей, органических растворителей сливать только в специально предназначенные для этого сосуды, имеющие соответствующие этикетки. Например, «Слив органических растворителей»; «Слив растворов кислот». Твердые отработанные компоненты – в специальную банку «Отработанные отходы». **Выливать и бросать их в раковину строго воспрещается!**

Соблюдать особую осторожность при работе с горючими веществами. Во избежание воспламенения их следует нагревать только на водяной бане.

Соблюдать осторожность при работе с концентрированными кислотами и щелочами. При попадании их на кожу или одежду немедленно и обильно смыть водой (в течение 10...15 мин), а затем в случае попадания кислоты промыть пораженный участок слабым раствором пищевой соды, в случае попадания щелочи – слабым раствором уксусной или борной кислоты.

В лаборатории нельзя принимать пищу. Для питья использовать пищевые, а не химические стаканчики.

По окончании работы вымыть руки с мылом.

3. Правила внутреннего распорядка для работающих в лаборатории

Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде, головных уборах. Работать рекомендуется в халатах.

При всех работах необходимо соблюдать максимальную осторожность. Соблюдать чистоту на рабочем месте, не держать на столе ничего постороннего.

Анализ проводить в строгом соответствии с руководством к работе, проверив исправность используемых приборов, целостность химической посуды.

Студент, работающий в лаборатории, обязан знать и соблюдать правила работы с концентрированными кислотами, щелочами, огнеопасными и ядовитыми веществами, органическими веществами.

Студент должен знать местонахождение в лаборатории противопожарных средств, аптечки и уметь пользоваться ими.

При несчастном случае немедленно обращаться к преподавателю.

По окончании работы вымыть за собой химическую посуду, выключить электронагревательные приборы и оставить столы в чистоте и порядке.

В каждой группе работающих студентов должен быть дежурный, отвечающий за выполнение правил внутреннего распорядка в лаборатории.

Тема 1.

БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА

Белковые вещества – важнейший класс биологически активных веществ, присутствующих в виде главных компонентов в любых формах живой материи – микроорганизмах, животных или растениях.

Белки – важнейшие для жизни полимеры, состоящие из остатков α -аминокислот, соединенных между собой пептидной связью. Каждый вид белка характеризуется своей уникальной последовательностью аминокислот в полипептидной цепи (первичная структура белков). Все белки имеют определенную пространственную ориентацию полипептидных цепей (вторичная, третичная и четвертичная структуры). По составу они подразделяются на простые белки (протеины), которые состоят только из остатков аминокислот, и сложные белки (протеиды), в которых полипептидная цепь соединена с небелковым компонентом – простетической группой. Белки – это единственный класс соединений, молекулы которых обладают способностью к взаимному превращению почти всех видов энергии.

Отдельные белки различаются не только по аминокислотному составу, но и по форме молекулы. Все белки по этому признаку разделяют на фибриллярные нитевидные и глобулярные шаровидные. К первой группе относят такие, как, например, кератин, содержащийся в рогах, волосах и копытах животных, фибриноген крови, миозин мускулов. Во вторую группу – глобулярных белков – входит подавляющее большинство белков, содержащихся в растениях, животных и микроорганизмах.

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.

Поступающие с пищей белки служат источником незаменимых и заменимых кислот, аминокислоты белков являются предшественниками гормонов и ряда других веществ. Роль белков в получении продуктов питания велика, так как они оказывают непосредственное влияние на гомеостаз человека.

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 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, сопровождающаяся потерей растворимости и свойственной им ферментативной активности.

Белки сами по себе не являются незаменимыми компонентами рациона человека. Они нужны для обеспечения организма незаменимыми аминокислотами, причем в определенном соотношении. В общем пищевом рационе за счет белков должно обеспечиваться около 12...15% калорийности пищи. Избыток белков необходим для обеспечения дополнительных затрат организма, связанных с повышенными физическими, психологическими нагрузками, неблагоприятными воздействиями внешней среды. Рекомендуемой нормой потребления принято считать 0,75 г белка на 1 кг массы тела для взрослых при условии адекватного количества незаменимых аминокислот в белках потребляемой пищи, имеющих высокую степень усвояемости.

Условно белковые продукты можно разделить на две группы. К первой группе относятся продукты животного происхождения – молоко, яйцо, мясо, рыба, белок которых легко и полностью усваиваются организмом человека. Ко второй группе относится большинство продуктов растительного происхождения, белки которых усваиваются организмом неполностью, а аминокислотный состав не содержит полного набора незаменимых аминокислот.

Ввиду многообразия природных белков для источников питания приняты критерии его оценки. Одним из таких критериев является питательная ценность. Питательная ценность белков определяется двумя факторами: аминокислотным составом и степенью усвояемости животным организмом. Ориентировочно биологическая ценность белков может быть выражена в виде шкалы. Белки молока, содержащие все незаменимые аминокислоты, принимаются за 100%, биологическая ценность мяса и рыбы будет 95%, картофеля – 80%, ржаного хлеба – 75%, риса – 58%, гороха – 55%, пшеницы – 50%. Более полная

оценка биологической ценности белка сводится к сопоставлению его аминокислотного состава с идеальной шкалой аминокислот – расчету аминокислотного сора:

$$C=A/N,$$

где С – скор;

А – содержание аминокислоты в белке оцениваемого объекта, г/100 г белка;

Н – содержание аминокислоты в эталонном белке, г/100 г белка.

Для выражения аминокислотного сора в процентах полученную величину умножают на 100.

Лимитирующей качества белка является аминокислота, показатель аминокислотного сора которой наименьший. На практике в качестве стандартных шкал используют данные аминокислотных составов женского молока и куриных яиц. К наиболее близким к полноценным сбалансированным по аминокислотному составу белкам относят животные белки (молока, куриного яйца, икры рыб, мозга животных и другие). Наименьшей биологической ценностью обладают белки злаковых.

Один грамм идеального белка по шкале ФАО/ВОЗ содержит (мг): изолейцина – 40, лейцина – 7-, лизина – 55, метионина и цистина – 35, фенилаланина и тирозина – 60, треонина – 40, триптофана – 10, валина – 50.

Для образования в организме человека необходимых белковых элементов потребляемые белки должны состоять из взаимосбалансированных количеств незаменимых аминокислот. В белках продуктов питания незаменимых аминокислот может быть значительно больше, чем в эталоне ФАО/ВОЗ. Однако возможность их утилизации организмом predetermined минимальным скором одной из аминокислот.

Методы определения белка могут быть разделены на качественные и количественные. Методы качественного обнаружения белков построены на двух типах реакций: по пептидным связям белковой молекулы и по ее аминокислотным радикалам.

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 ти-

розина, реакция Адамкевича и Вуазене – триптофана, реакция Фоля и нитропруссидная реакция – серосодержащие аминокислоты, 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 – определение белка по содержанию азота, который является унифицированным методом 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 (рис. 1.1).

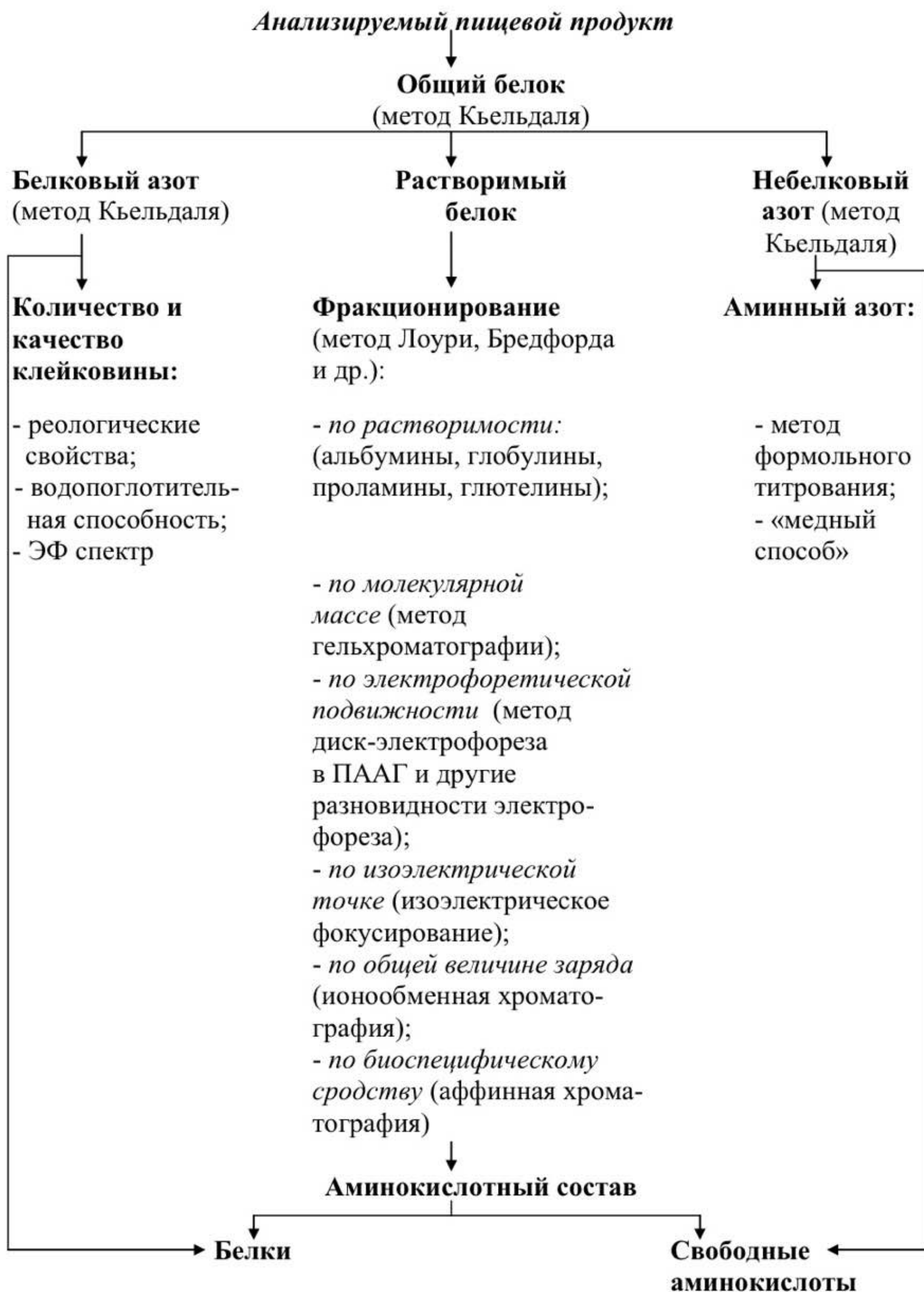


Рисунок 1.1 – Анализ белков

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

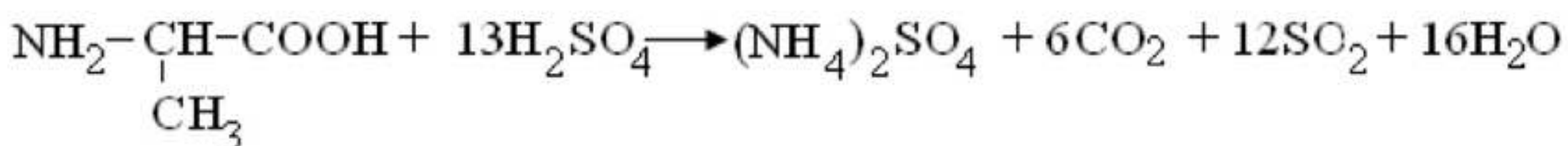
1.2.1. Определение общего азота по методу Кьельдаля

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.

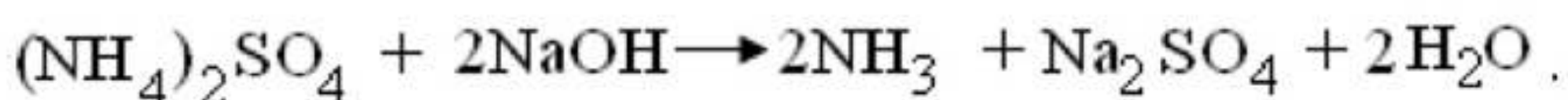
Определение азота по методу Кьельдаля сводится к двум основным операциям:

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 сульфита 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%-й 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.

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 мл концентрированной серной кислоты и добавляют катализатор.



Рисунок 1.2 –
Колба Кьельдаля

Сжигание сначала проводят при температуре $60...100^{\circ}\text{C}$, 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, потому что 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 мл 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).

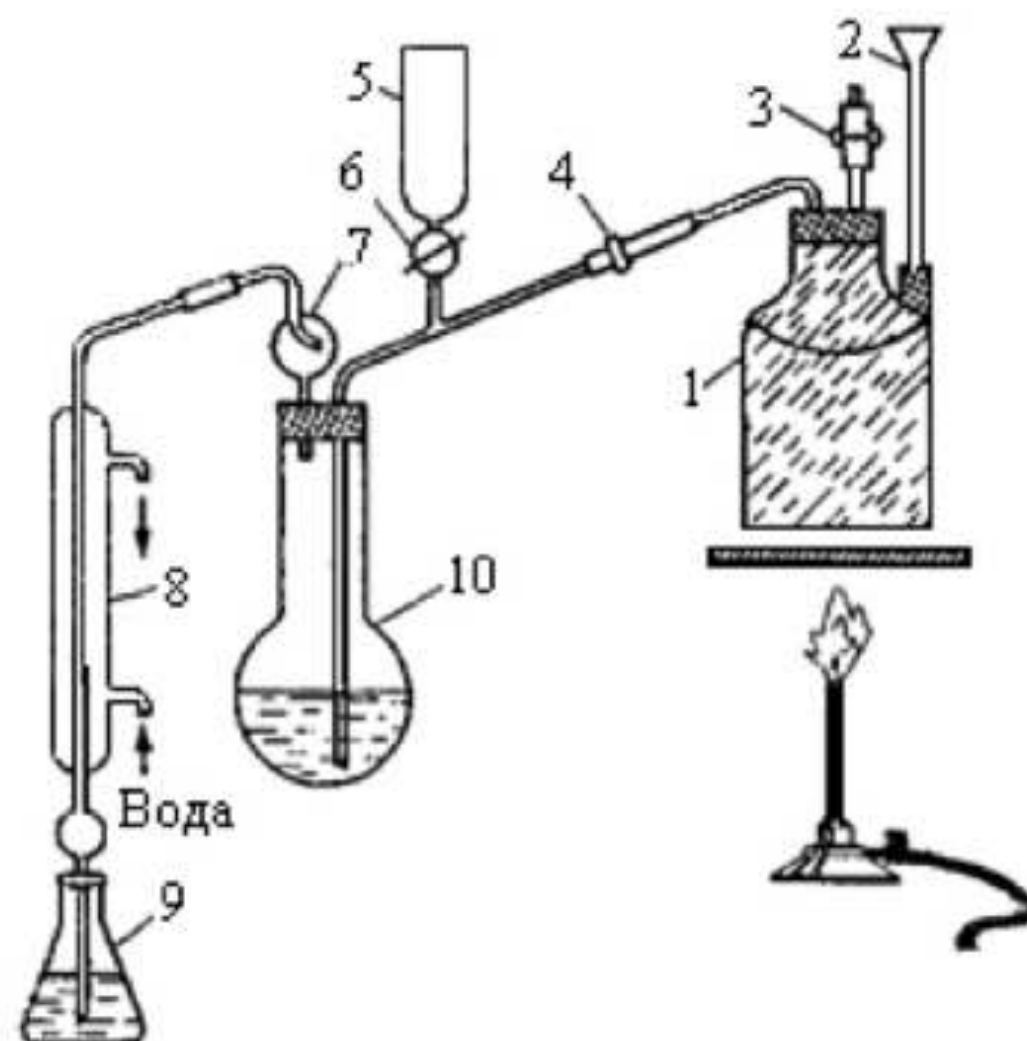


Рисунок 1.3 – Аппарат для отгонки аммиака:

- 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 Кьель-

даля, обмывая несколько раз колбу небольшими порциями дистиллированной воды, промывные воды также переносят в реакционный сосуд. Добавляют концентрированный раствор щелочи (30...50 мл) 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 мин. Затем стаканчик с титрованным раствором кислоты опускают так, чтобы конец трубки холодильника был выше уровня жидкости. Отгонку продолжают еще 2...3 мин, при этом стекающий дистиллят обмывает от кислоты (внутренние стенки трубки холодильника), а с наружной 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 мл 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.

1.2.2. 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:

А. 2%-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. NaOH ; В. 0,5%-й $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м растворе виннокислого натрия; С. 50 мл А + 1 мл В (годен в течение одного дня); D. Разбавленный реактив Фолина.

Методика проведения анализа

0,4 мл испытуемого раствора белка (50...500 мг) и 2 мл реактива С перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 0,2 мл реактива D (очень быстро перемешивают (в течение 1...2 с) и оставляют на 30...40 мин 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.

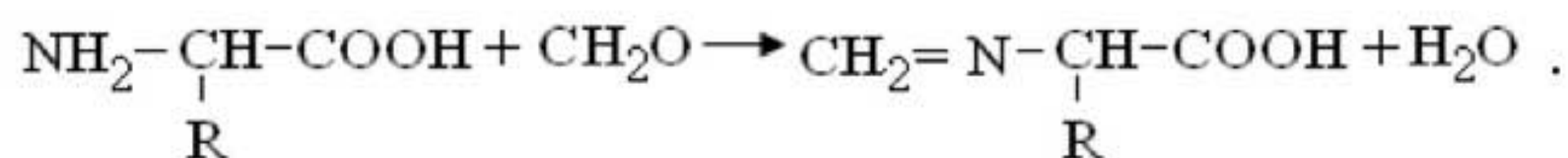
Определению белка по методу Лоури мешают мочева кислота, гуанин и гликокол, ксантин, сернокислый аммоний при массовой доле в среде более 5%.

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%).

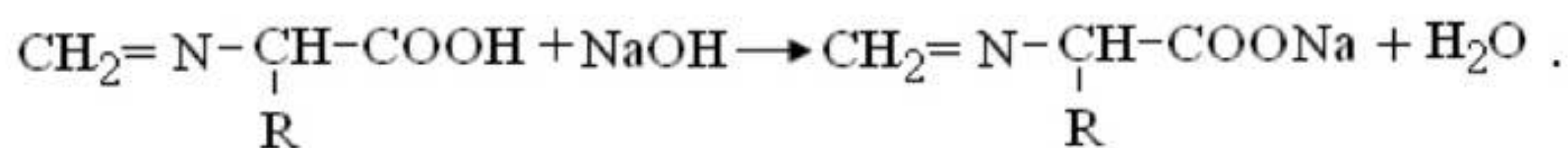
1.2.3. Определение аминного азота методом формольного титрования

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%-й раствор; 1%-й спиртовой раствор фенолфталеина; NaOH – 0,05 н. раствор; Индикатор – бромтимоловый синий.

Методика проведения анализа

К 20 мл испытуемого раствора (2 мл образца + 8 мл воды) и к 20 мл 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 мл формольной смеси (50 мл 40%-го раствора формалина и 2 мл 1%-го спиртового раствора фенолфталеина, после чего раствор титруют 0,05 н. NaOH до ярко-синего окрашивания (pH 9,7). Расчет аминного азота ведут по формуле

$$X = (a - б) \cdot T \cdot 0,7,$$

где X – количество аминного азота, содержащегося в 2 мл исследуемого образца; а – количество мл 0,05 н. NaOH, израсходованного на титрование испытуемого образца; T – поправка к титру; 0,7 – коэффициент пересчета, при использовании 0,05 н. NaOH (1 мл 0,05н. NaOH соответствует $14 \cdot 0,05 = 0,7$).

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 изoeлектрической 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).

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 рисунке 1.4 представлены возможные конструкции колонок, а на рисунке 1.5 – схема устройства для колоночной хроматографии.

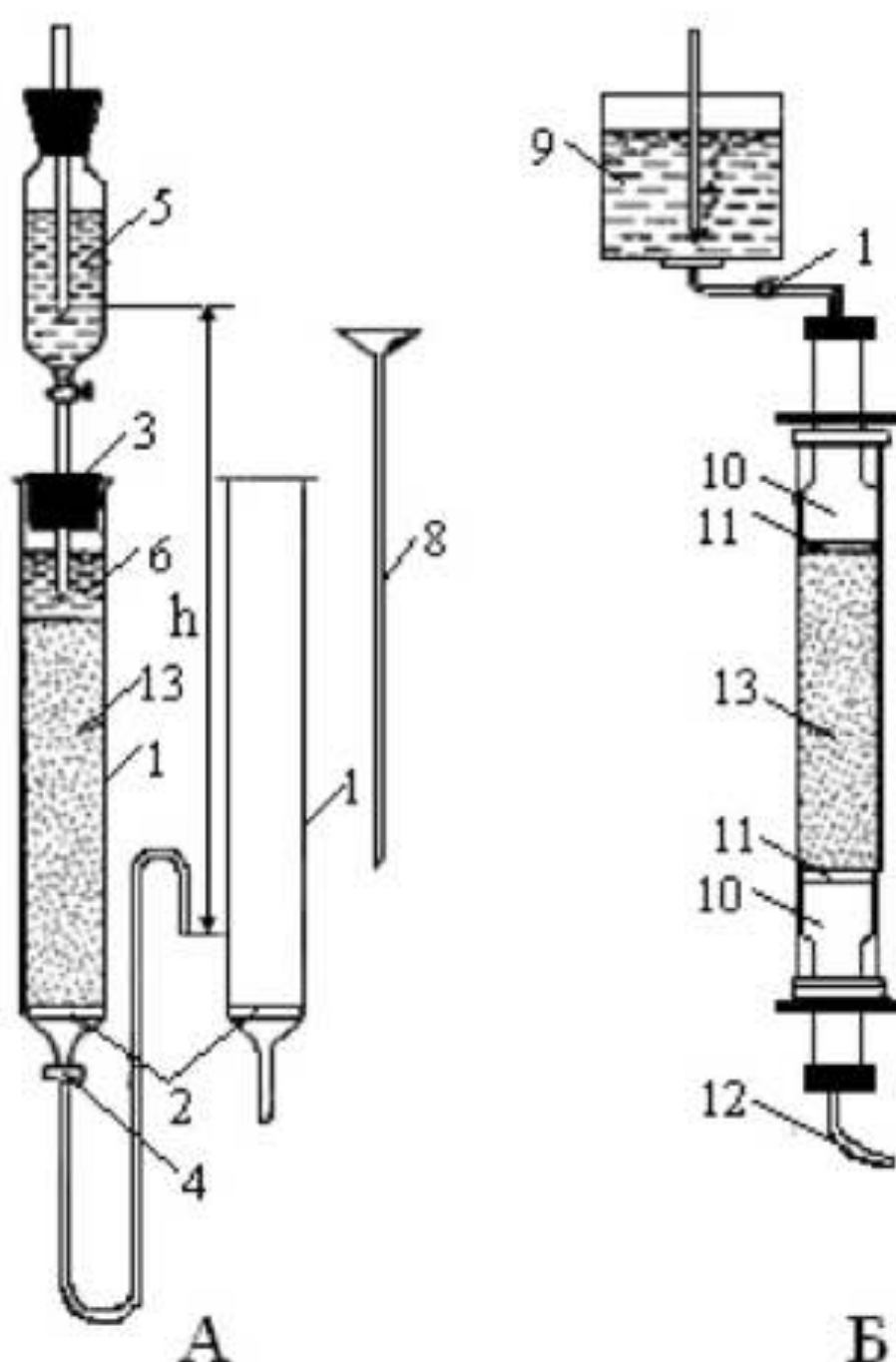


Рисунок 1.4 – Хроматографические колонки упрощенного (А) и усложненного (Б) типа:

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

Наиболее широкое распространение среди носителей для гель-хроматографии белков получили сорбенты, приготовленные на основе декстрана (сефадексы, сефакрилы, молселекты), полиакриламида (биогели Р, акрилексы) и агарозы (сефарозы, биогели А) и др.

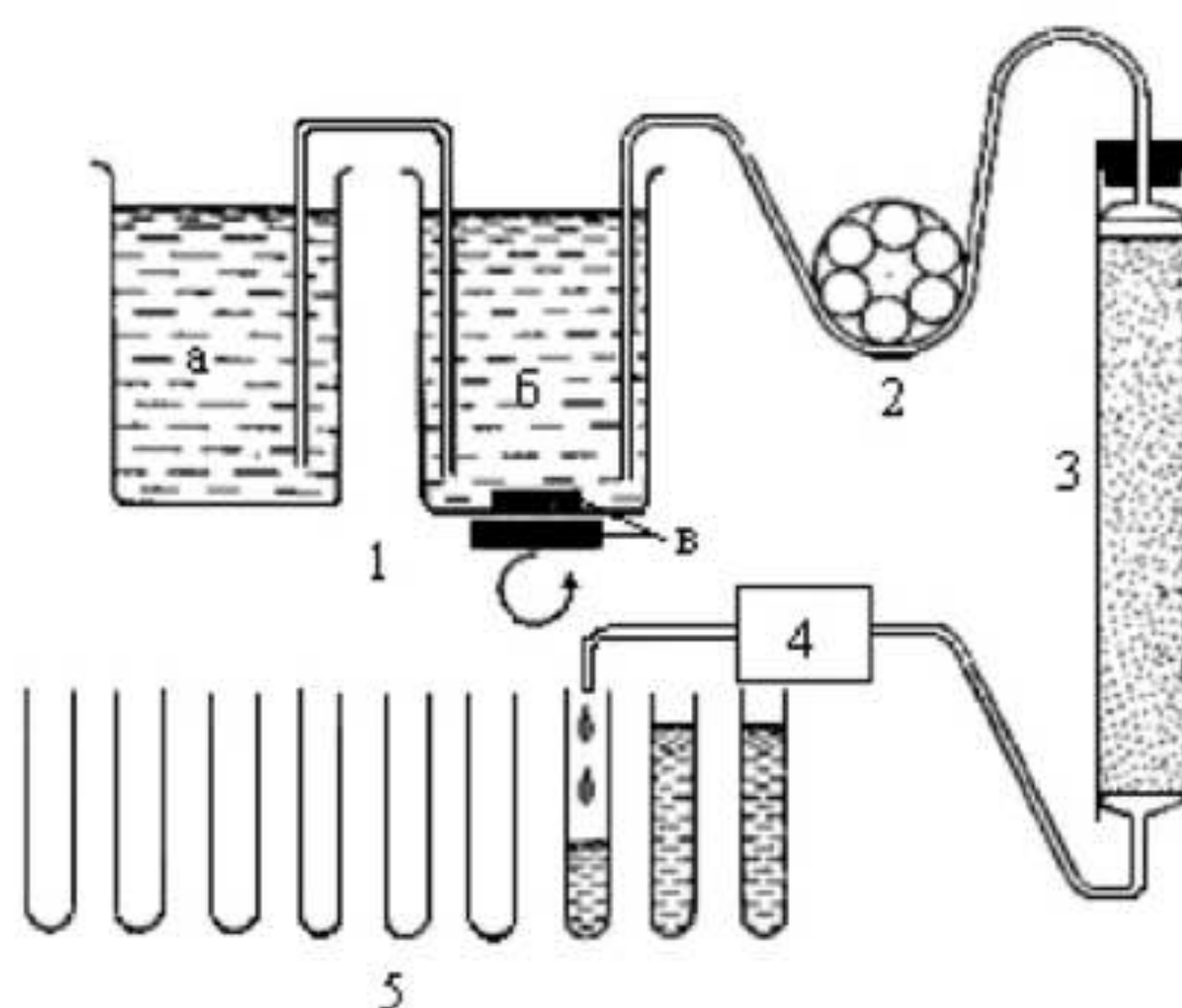


Рисунок 1.5 – Схема устройства для колоночной хроматографии: 1 – прибор для создания линейного градиента (а – сосуд с раствором высокой концентрации, б – сосуд-смеситель, в – магнитная мешалка); 2 – перистальтический насос; 3 – колонка; 4 – УФ-детектор; 5 – коллектор фракций

Сефадексы – продукты взаимодействия полисахарида декстрана с эпихлоргидрином. Они устойчивы к органическим растворителям, растворам щелочей и разбавленных кислот (до 0,1 н.). Рабочий диапазон pH 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).

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

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

$$V_{\text{общ}} = V_{\text{вн}} + V_{\text{св}} .$$

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).

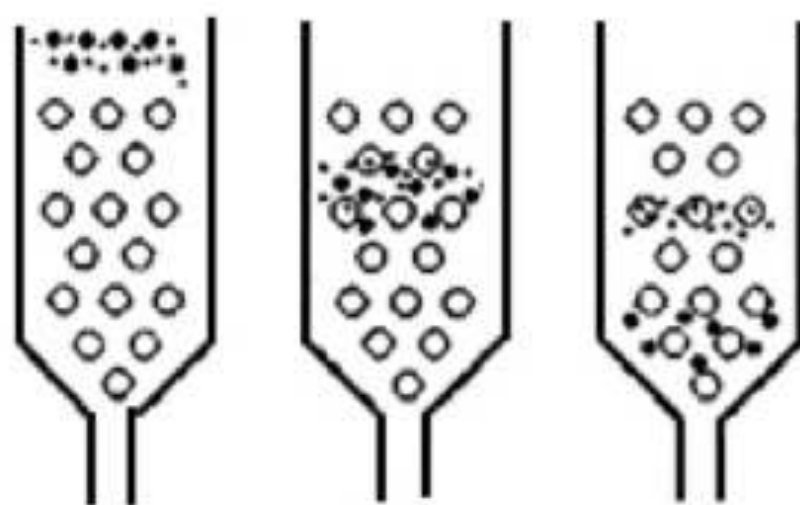


Рисунок 1.6 – Разделение веществ на колонке с сефадексом

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:

$$V_{эл} = V_{св}.$$

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

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

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

$$V_{св} < V_{эл} < V_{общ}.$$

Разделение веществ происходит в объеме:

$$V_{общ} - V_{св}.$$

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:

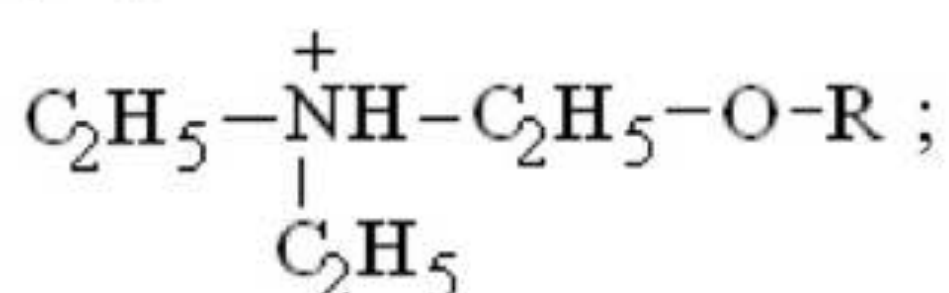
- для обессоливания (т.е. отделения высокомолекулярных соединений от низкомолекулярных);
- для смены буфера;
- для разделения высокомолекулярных соединений (белков, углеводов) с различной молекулярной массой;
- для определения молекулярной массы;
- для концентрирования растворов высокомолекулярных соединений,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

1.3.2. Метод ионообменной хроматографии

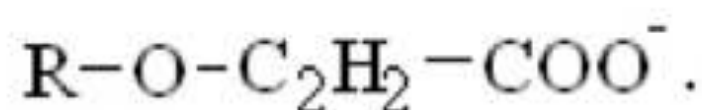
Методом ионообменной хроматографии разделяют белки или аминокислоты на основе различий в общем заряде молекул. Разделение веществ с помощью ионообменной хроматографии проводят на колонках, заполненных ионообменной смолой (катионо- или анионообменники).

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. Электрофоретическое разделение белков

Метод основан на том, что молекулы белка обладают электрическим зарядом, величина и знак которого определяются аминокислотным составом, рН, 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.

1.3.4. Изоэлектрическое фокусирование белков

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

Метод изоэлектрического фокусирования включает электрофоретическую миграцию белка в условиях градиента рН. Белок движется под действием электрического поля, пока не достигнет такой области, где рН равен pH_i белка. Суммарный заряд белка становится равным нулю, и белок концентрируется в этой области в виде узкой зоны.

В работе используют стандартную колонку объемом 110 мл. Для предотвращения перемешивания зон разделение ведут в градиенте плотности сахарозы. Колонку заполняют с помощью перистальтического насоса и смесителя. Скорость заполнения колонки – 100 мл/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 мл со скоростью 50 мл в час. В собранных фракциях регистрируют содержание белка и рН.

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

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, в 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 мл 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 мл (дальнейшие операции определения белка по Кьельдалю см. п. 1.2.1).

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 значительных 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 мл раствора 1 + 2 мл воды.....	80
7 мл раствора 1 + 3 мл воды.....	70
6 мл раствора 1 + 4 мл воды.....	60
5 мл раствора 1 + 5 мл воды.....	50
5 мл раствора 2 + 5 мл воды.....	40
5 мл раствора 3 + 5 мл воды.....	35
5 мл раствора 4 + 5 мл воды.....	30
5 мл раствора 5 + 5 мл воды.....	25
5 мл раствора 6 + 5 мл воды.....	20
5 мл раствора 8 + 5 мл воды.....	15
5 мл раствора 10 + 5 мл воды.....	10
3 мл раствора 11 + 6 мл воды.....	5

Определение белка по методу Лоури

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

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

Результаты заносят в таблицу по образцу таблицы 1.1.

Таблица 1.1 – Результаты определения белка по методу Лоури

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

Для получения надежных результатов работу дублируют несколько раз, поручая группе из 2...3 студентов построение калибровочной кривой. 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/мл». 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 позволяют 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 особенностей 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 известна 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; 0,1н.НСl; 10%-й 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 мельнице, клубни картофеля измельчают на терке и отжимают сок.

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

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

Осаждение белков раствором ТХУ

В пробирки вносят растворы в количествах, указанных в таблице 1.2.

Содержимое пробирок встряхивают и оставляют на 20 мин 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 в таблицу 1.2 и строят график осаждения белка нарастающими концентрациями ТХУ. Определяют концентрацию ТХУ, достаточную для максимального осаждения белков.

Таблица 1.2 – Данные для построения графика осаждения белка раствором ТХУ

Раствор белка, мл	H ₂ O, мл	ТХУ, мл	Кратность разведения исходного раствора	Оптическая плотность, А	Содержание белка, мг/мл	
					в надосадочной жидкости	в осадке
5	5	0				0
5	4	1				
5	3	2				
5	2	3				
5	0	5				

Осаждение белков при изменении рН среды

В пробирки вносят растворы в количествах, указанных в таблице 1.3.

В пробирки с раствором белка вначале вносят заданное количество соляной кислоты, содержимое пробирок встряхивают и оставляют на 20 мин 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.

Таблица 1.3 - Данные для построения графика осаждения белка при изменении рН среды

Раствор белка, мл	H ₂ O, мл	0,1н HCl, мл	Кратность разведения исходного раствора	Оптическая плотность, А	Содержание белка, мг/мл
5	5	0			
5	3	2			
5	2	3			
5	1	4			
5	0	5			

Осаждение белков насыщенным раствором (NH₄)₂SO₄.

В пробирки вносят растворы в количествах, указанных в таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Данные для построения графика осаждения белка раствором (NH₄)₂SO₄

Раствор белка, мл	H ₂ O, мл	(NH ₄) ₂ SO ₄ , мл	Кратность разведения исходного раствора	Оптическая плотность, А	Содержание белка, мг/мл	
					в над-осадочной жидкости	в осадке
5	5	0				0
5	4	1				
5	3	2				
5	2	3				
5	0	5				

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

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

Лабораторная работа 1.4.3 **Фракционирование белков различной природы по растворимости**

Классификация белков по растворимости (в воде, растворах солей, кислот, щелочей и спирта) применяется только для простых белков:

- *Белки, растворимые в слабых кислотах*, – это наиболее простые белки, обладают невысокой молекулярной массой и проявляют основные свойства (суммарный заряд положительный):

- протамины обладают сильноосновными свойствами, растворимы в слабых кислотах, содержат до 80% аминокислот основной природы (лизин, гистидин, аргинин);

- гистоны обладают менее основными свойствами, чем протамины (содержание аминокислот основной природы до 30%), они выполняют стабилизирующую функцию при формировании третичной структуры ДНК у эукариот.

- *Белки, растворимые в воде и растворах нейтральных солей*, обладают более высокой молекулярной массой, чем гистоны и протамины, часто выполняют в организме каталитическую функцию:

- альбумины хорошо растворяются в воде и высаживаются из насыщенных растворов нейтральных солей;

- глобулины растворяются в слабых растворах нейтральных солей, высаживаются при высоких концентрациях нейтральных солей и выполняют защитные функции в организме.

- *Белки, растворимые в спиртах и растворах щелочей*, – это высокомолекулярные белки, не растворимые в воде, встречаются в семенах растений, выполняют запасные функции:

- проламины не растворимы в воде и солях, растворимы в 70%-м спирте, содержат много пролина;

- глютелины не растворимы в воде и разбавленных растворах нейтральных солей, растворимы в разбавленных щелочных растворах (0,2...2%-м растворах едкого натра) и выполняют не только запасную функцию, но обладают и биологической активностью.

Растительные белки

Белки *зерновых* неравномерно распределены между морфологическими частями зерна. Основное количество белка содержится в эндосперме (65...75%), на алейроновый слой приходится 15% белка, а 22% – на долю зародыша. Белки эндоспермы и алейронового слоя представлены различными фракциями, белки зародыша в основном каталитическими белками (альбуминами и глобулинами). Альбуминовые и глобулиновые фракции белков пшеницы разнородны и проявляют либо каталитическую активность, либо свойства ингибиторов ферментов. В количественном отношении главными белками пшеницы являются две фракции: глиадин (проламин пшеницы) и глютеин (глютелины пшеницы).

Основная фракция белков *бобовых* – глобулиновая (60...90%). Она представляет собой группу запасных белков и извлекается 5...10%-м раствором хлорида натрия из обезжиренной муки. Белки бобовых содержат лизина в 2...2,5 раза больше, чем злаковые, а растворимость и перевариваемость их выше, чем у других белков растений. В качестве самостоятельной группы в семядолях бобовых не обнаружены глютелины. Извлекаемые щелочными растворами белки представляют собой глобулины, связанные с полисахаридами.

На долю альбуминовой фракции приходится 10...20% белков бобовых. Они не являются запасными, основная роль альбуминовых белков – физиологическая, они представляют собой группу биологически активных веществ. Это главным образом ферменты и ингибиторы ферментов. В альбуминовой фракции встречаются ингибиторы трипсина, цитохромы с, β -амилазы, липооксидазы. Отличительной особенностью белкового комплекса бобовых является высокое содержание ингибиторов протеаз и особых белков гликопротеидной природы – лектинов.

Цель работы: провести экстракцию и последующий анализ белков растительного происхождения по растворимости.

Реактивы: мука пшеничная, гороховая; 10%-й и насыщенный растворы сульфата аммония, сухой сульфат аммония (мелко размоло-

тый); 0,2%, 1%, 10%-е растворы гидроксида натрия; 0,1 н, 3%-е растворы уксусной кислоты; биуретовый реактив; 10%-й и насыщенный растворы хлорида натрия; сухой хлорид натрия (мелко размолотый); 70%-й раствор этилового спирта.

Посуда и приборы: капельницы; стеклянные воронки; фарфоровые ступки и пестики; фильтровальная бумага; марля; технические весы с разновесами; термостат; плоскодонные колбы объемом 100 мл; пробирки; пипетки; водяные бани.

Методика проведения анализа

Выделение водорастворимых белков пшеницы

Пшеничную муку в количестве 2 г растереть в фарфоровой ступке с 10 мл дистиллированной воды. Полученной смеси дать отстояться 2...3 мин, затем отфильтровать. Остаток муки промыть два раза небольшими порциями дистиллированной воды и оставить для последующего извлечения глобулинов пшеницы. Полученный фильтрат использовать при исследовании растворимости альбуминовых белков.

К фильтрату альбуминовой фракции белков добавить сухой тонкоизмельченный порошок сульфата аммония при небольшом нагревании (не выше 40°C) до полного насыщения (до прекращения растворения сульфата аммония). Выпавший осадок, представляющий собой альбуминовую фракцию белков пшеницы, отфильтровать.

Осадок на фильтре растворить в 1 мл дистиллированной воды. В полученном растворе доказать наличие белков, добавив в него 1 мл би-урстового реактива.

Выделение солерастворимых белков пшеницы

Промытый водой остаток муки (после извлечения альбуминовой фракции белков) растереть в ступке с 10 мл 10%-го раствора хлорида натрия, дать отстояться 2...3 мин и отфильтровать. Остаток муки промыть два раза небольшими порциями свежего раствора хлорида натрия и оставить для следующих опытов. Полученный фильтрат использовать при исследовании растворимости глобулиновых белков пшеницы. Для этого добавить к фильтрату равный объем насыщенного раствора хлорида натрия, достигнув тем самым полунасыщения. Выпавший осадок, представляющий собой глобулиновую фракцию белков пшеницы, отфильтровать. Осадок растворить на фильтре в

1 мл 10%-го раствора хлорида натрия. Провести реакцию с биуретовым реактивом.

Выделение белков пшеницы, растворимых в щелочах

Остаток муки (после удаления альбуминовой и глобулиновой фракции белков) растереть в фарфоровой ступке с 10 мл 0,2%-го раствора гидроксида натрия, дать отстояться 2...3 мин и отфильтровать. К фильтрату добавить по каплям 0,1 н раствор уксусной кислоты. Выпавший осадок представляет собой глютенин – глютелин пшеницы.

Выделение белков пшеницы, растворимых в спиртах

В фарфоровой ступке растереть 1 г пшеничной муки с 5 мл 70%-го этилового спирта. Полученной суспензии дать отстояться и отфильтровать. К 3 мл фильтрата добавить по каплям дистиллированную воду до выпадения осадка. Полученный осадок представляет собой глиадин – проламин пшеницы.

Выделение водорастворимых белков гороха

Экстракцию белков вести аналогично экстракции альбуминов пшеницы.

Выделение солерастворимых белков гороха (легумина)

В гороховой муке содержится глобулиновый белок легумин, не растворимый в воде, но растворимый в растворах нейтральных солей. Для извлечения легумина 5 г гороховой муки залить 20 мл 10%-го раствора сульфата аммония и экстрагировать в термостате в течение 20 мин при температуре 30⁰С (при постоянном перемешивании). Полученный раствор отфильтровать через складчатый фильтр, смоченный раствором соли. Фильтрат использовать для исследования растворимости глобулиновых белков гороха. Для этого добавить к 1 мл фильтрата 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Выпавший осадок легумина отфильтровать и растворить на фильтре в 1 мл 10%-го раствора хлорида натрия. Провести реакцию с биуретовым реактивом.

Полученные результаты свести в таблицу (по образцу табл. 1.5), оформить выводы по работе.

Таблица 1.5 – Результаты качественного анализа фракционного состава исследуемого белка

Исходный материал	Растворитель	Название растворимого белка	Из какого растворителя высаливается	Реакция на белок

Лабораторная работа 1.4.4 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%-й раствор NaCl – элюирующий раствор; декстран синий; биохромат калия; сахароза.

Методика проведения анализа

Заполнение колонки сефадексом

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

Колонку (размером 2,0x50 см) укрепляют на штативе строго вертикально, в основание помещают либо небольшое количество стекловаты, либо диск из мелкопористого поролон, на который сверху помещают кружок фильтровальной бумаги. Порошок сефадекса предварительно замачивают в воде или рабочем буфере, в зави-

симости от свойств сефадекса и объема колонки (см. п. 1.2.5). Например, для набухания 1 г сефадекса G-50 необходимо 5 мл воды.

Перед заполнением колонки набухшим сефадексом в нее наливают небольшое количество элюирующей жидкости (вода, буферный раствор и т.д.) и удаляют пузырьки воздуха. После этого колонку начинают заполнять: медленно тонкой струей приливают 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 образца на колонку проводят двумя способами:

1. 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 нарушить поверхностный слой.

2. 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.

Калибровка колонки

Колонку, заполненную набухшим сефадексом G-50, необходимо откалибровать, т.е. установить $V_{св}$ и $V_{общ}$. Для этой цели используют смесь высокомолекулярного вещества ($k = 0$), выходящего со свободным объемом ($V_{св}$) – декстрана синего (молекулярная масса около 2 млн Дальтон), и низкомолекулярного вещества, выходящего с объемом элюции, равным $V_{общ}$, – 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 мл смеси. Нанесение образца проводят под слой жидкости (для этого образец утяжеляют сахарозой). Элюцию ведут 0,9%-м раствором NaCl. После нанесения образца открывают зажим и собирают элюат фракциями по 5 мл. Отбор фракций заканчивают выходом 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).

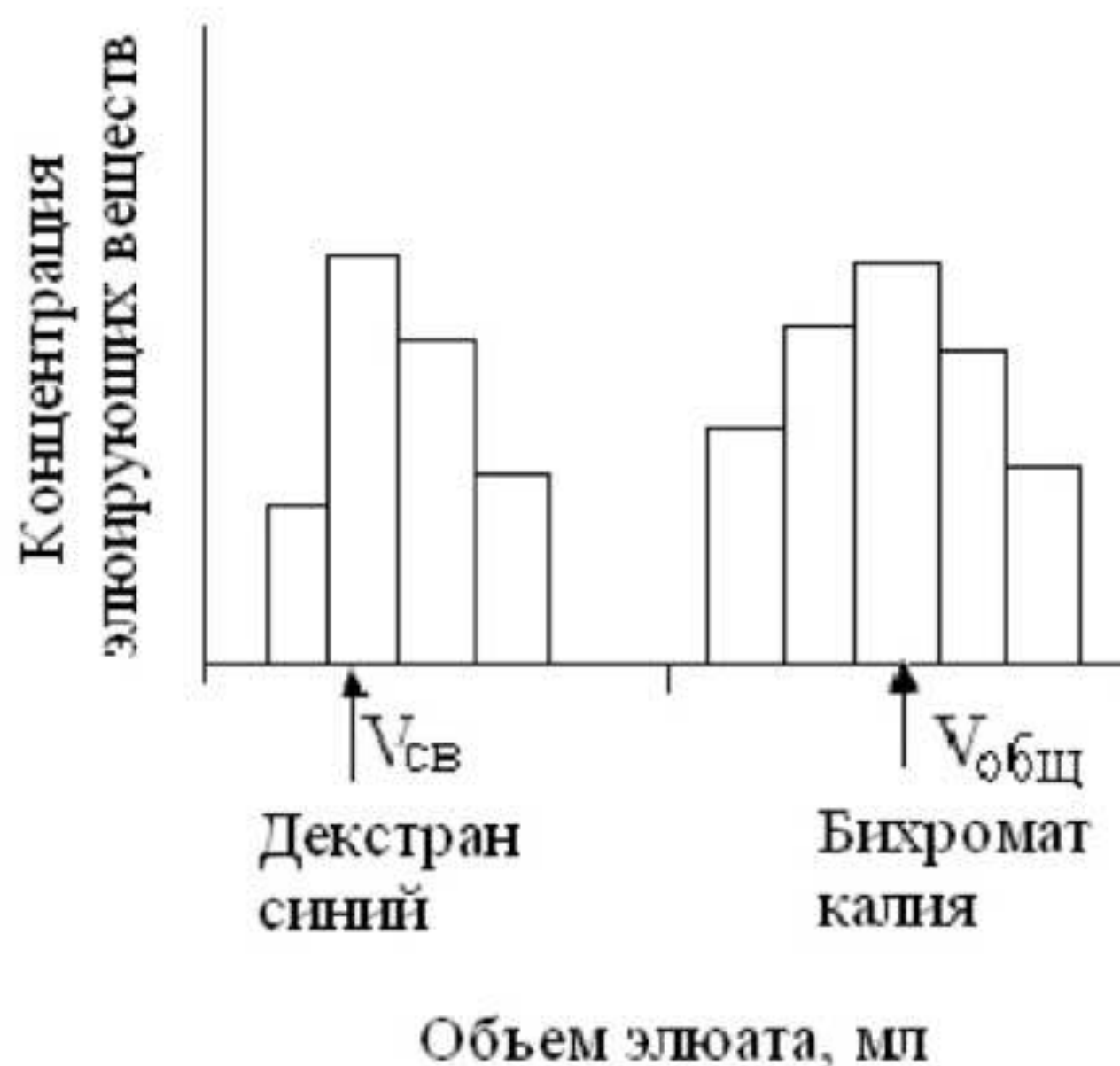


Рисунок 1.7 – Диаграмма элюции при калибровке колонки

Лабораторная работа 1.4.5

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 и пшеничный солод; раствор крахмала (2мг/мл); 0,1 н HCl; реактивы для определения белка по Лоури; реактив Фелинга (смесь равных объемов 4%-го раствора CuSO_4 и щелочного раствора сегнетовой соли).

Подготовка образца

К 5 г измельченного материала (пшеничный или ячменный солод) добавляют 50 мл дистиллированной воды. Затем в течение 5 мин подвергают интенсивному перемешиванию, после чего центрифугируют при 6000 об/мин в течение 10 мин. Осадок отбрасывают, надосадочная жидкость используют для фракционирования и опре-

деления 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 мл надосадочной жидкости, причем нанесение проводят на слой геля. Элюцию проводят 0,9%-м раствором NaCl. Элюат собирают фракциями по 4 мл в мерные пробирки. Собранные фракции исследуют: а) на содержание белка, б) активность амилаз, в) качественное определение восстанавливающих сахаров.

1. Содержание белка определяют в каждой фракции по методу Лоури. Данные записывают в таблицу 1.6.

Таблица 1.6 – Содержание белка в различных фракциях

Номер фракции	Оптическая плотность, A_{630}	Содержание белка, мг/мл
1		
2		
3		
и т.д. до $V_{\text{общ}}$		

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

Методика проведения анализа

В пробирку вносят 5 мл раствора крахмала (2 мг/мл), 4 мл дистиллированной воды и 1 мл фермента. Содержимое пробирок быстро перемешивают и отбирают пробу 2 мл через 10 мин после внесения фермента. Пробу переносят в пробирку с 2 мл 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/мл):

Раствор

Содержание крахмала, мг/мл

1. Исходный раствор крахмала.....	2,0
2. 2,0 мл исходного крахмала + 2,0 мл воды.....	1,0
3. 1,0 мл исходного крахмала + 3,0 мл воды.....	0,5
4. 1,0 мл исходного крахмала + 4,0 мл воды.....	0,4
5. 1,0 мл исходного крахмала + 9,0 мл воды.....	0,2
6. 0,5 мл исходного крахмала + 9,5 мл воды.....	0,1

Из каждой пробирки серии разведений отбирают по 2 мл раствора крахмала, добавляют 2 мл раствора йода на 0,1 н. НС1 и колориметрируют на ФЭКе при красном светофилтре (630 нм). Полученные данные заносят в таблицу (табл. 1.7) и строят калибровочный график в координатах: «оптическая плотность – концентрация крахмала, мг/мл».

Таблица 1.7 – Данные для построения калибровочного графика

Крахмал, мг/мл	Оптическая плотность, A_{630}
0,1	
0,2	
0,4	
0,5	
1,0	
2,0	

Определение восстанавливающих сахаров проводят в оставшихся фракциях. В пронумерованные пробирки вносят из бюретки по 1 мл раствора Фелинга (запрещается пользоваться пипеткой!) и содержимое оставшихся фракций (4 мл). 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. 1.8).

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

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.

Таблица 1.8 – Данные для построения графика фракционирования веществ

Номер фракции	Объем элюата, мл	Белок		Амилаза				Восстанавливающие сахара
		A_{630}	мг/мл	A_{630}	Х, мг крахмала	(С–Х), мг крахмала	УА, мг/мл белка	
1								
2								
3								
и т.д. до $V_{\text{общ}}$								

Примечание. Х – остаточная концентрация крахмала, С – исходная концентрация крахмала с учетом разведения, (С–Х) – количество гидролизованного крахмала, УА – удельная активность амилаз.

Лабораторная работа 1.4.6

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 «пищевой ценности» 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.

Коэффициент различия аминокислотных скорое (КРАС, %) показывает избыточное количество НАК, не используемых на пластические нужды, и рассчитывается он как средняя величина избытка АС незаменимой аминокислоты относительно наименьшего сора той или иной кислоты:

$$\text{КРАС} = \frac{\sum \Delta \text{РАС}}{n} \% ; \Delta \text{РАС} = \Delta \text{АС}_i + \text{АС}_{\min} ,$$

где $\Delta \text{РАС}$ – различие аминокислотного сора аминокислоты, %; n – количество НАК; $\Delta \text{АС}_i$ – избыток сора i -й аминокислоты, % ($\Delta \text{АС}_i = \text{АС}_i - 100$, АС_i – аминокислотный скор для i -й незаменимой кислоты); АС_{\min} – скор лимитирующей кислоты, %.

Коэффициент утилизации i -НАК (K_i) – характеристика, отражающая сбалансированность НАК по отношению к эталонному белку. Рассчитывается по формуле

$$K_i = \frac{\text{АС}_{\min}}{\text{АС}_i} .$$

Коэффициент рациональности аминокислотного состава (R_c) отражает сбалансированность НАК относительно эталона и рассчитывается по формуле

$$R_c = \frac{\sum_{i=1}^k (A_i K_i)}{\sum_{i=1}^n A} ,$$

где K_i – коэффициент утилитарности i -НАК; A_i – массовая доля i -й аминокислоты в г эталонного белка, мг/г.

Аминокислотный скор белка (АС) – это отношение количества незаменимых аминокислот (НАК) в исследуемом белке к количеству этой же аминокислоты в идеальном белке.

Эталонный (идеальный) белок – это гипотетический продукт, состав которого идеально удовлетворяет физиологическую потреб-

ность организма в незаменимых аминокислотах. Аминокислотный состав такого белка предложен Комитетом ФАО/ВОЗ в 1985 году и показывает содержание каждой из незаменимых аминокислот в 1 г белка (табл. 1.9).

Таблица 1.9 – Аминокислотная шкала и суточная потребность в незаменимых аминокислотах в различном возрасте

Аминокислота	Эталонный белок, г/100 г белка	Дети 2–5 лет	Дети 10–12 лет	Подростки	Взрослые
		мг/кг массы тела в сутки			
Изолейцин	4	31	28	13	10
Лейцин	7	73	44	19	14
Лизин	5,5	64	44	16	14
Метионин + цистеин	2,5	27	22	17	13
Фенилаланин + тирозин	6	69	22	19	14
Треонин	4	37	28	9	7
Триптофан	1	12,5	9	5	3,5
Валин	5	38	25	13	10

Скор выражают в процентах:

$$AC = \frac{\text{мг (г) НАК в 100 г. белка продукта}}{\text{мг (г) НАК в 100 г. эталонного белка}} \cdot 100\%$$

Аминокислотный скор может выражаться в процентах от 0 – 100% или в долях 0 – 1.

Аминокислота, скор которой имеет наименьшее значение, называется *лимитирующей*. В продуктах с низкой биологической ценностью лимитирующих аминокислот со скором менее 100% может быть несколько. В таком случае речь идет о первой, второй и третьей лимитирующих 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 куриного яйца и молока. Нет дефицита незаменимых аминокислот в

мясе и мясопродуктах, рыбе и морепродуктах. Аминокислотный скор их приближается к 100%.

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 биологическая ценность и аминокислотный скор 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.

Для определения аминокислотного сора какого-либо продукта необходимо:

- 1) вычислить содержание аминокислот в 100 г белка этого продукта;
- 2) последовательно сравнить содержание той или иной аминокислоты с вышеуказанной стандартной шкалой ФАО/ВОЗ.

В идеальном (стандартном) белке аминокислотный скор каждой незаменимой кислоты принимается за 100%. Лимитирующей биологическую ценность аминокислотой считается та, скор которой имеет наименьшее значение. Биологическая ценность белков пищевых продуктов определяется по первой лимитирующей аминокислоте.

Пример:

Рассчитать скор по незаменимым аминокислотам для хлеба пшеничного из муки высшего сорта.

Расчет:

Находим в таблицах химического состава содержание незаменимых аминокислот в хлебе.

Так, содержание лизина в хлебе из пшеничной муки высшего сорта составляет 189 мг (0,189 г) на 100 г продукта.

Для расчета аминокислотного сора необходимо рассчитать эту величину в г на 100 г белка. В хлебе содержится 7,59 г белка.

Следовательно,

7,59 г белка содержат 0,189 г лизина;

100 г белка содержат X г лизина,

$$\text{тогда } X = \frac{100 \cdot 0,189}{7,59} = 2,49 \text{ г.}$$

Сравниваем полученное значение с содержанием лизина в эталонном белке по шкале ФАО/ВОЗ:

$$AC = \frac{2,49}{5,5} = 0,45.$$

Таким образом, лизин является лимитирующей аминокислотой для хлеба пшеничной муки высшего сорта, так как скор по данной аминокислоте меньше 1.

Аналогично производится расчет по всем незаменимым аминокислотам, и определяются первая и вторая лимитирующие аминокислоты.

Лимитирующей незаменимой аминокислотой считается та аминокислота, AC которой наименьший.

Задание

Определить и сравнить биологическую ценность белков двух пищевых продуктов (одного растительного, другого животного). Результаты свести в таблицу (табл. 1.10).

Таблица 1.10 – Расчет аминокислотного сора пищевых продуктов

Аминокислота	Содержание незаменимых аминокислот					Аминокислотный скор	
	Эталонный белок, г на 100 г белка	Продукт животного происхождения		Продукт растительного происхождения			
		На 100 г продукта	На 100 г белка	На 100 г продукта	На 100 г белка	Продукт животного происхождения	Продукт растительного происхождения
1	2	3	4	5	6	7	8
Изолейцин							
Лейцин							
Лизин							
Метионин + цистин							

1	2	3	4	5	6	7	8
Фенилаланин + тирозин							
Треонин							
Триптофан							
Валин							
Лимитирующая аминокислота, скор %							

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. Способы осаждения белков, используемые для сохранения нативной структуры 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. Методы, используемые для очистки белков. Какие существуют критерии однородности белковых препаратов?
8. Сущность метода гель-хроматографии, применяемого для разделения белков.
9. Назовите способы нанесения образцов на колонку с сефадексом.
10. Как определить свободный и внутренний объем колонки при разделении белков методом гель-хроматографии?
11. Биологические и химические методы определения качества белка в пищевых продуктах.
12. Как рассчитать аминокислотный скор белков?
13. Дайте сравнительную характеристику качества растительного и животного белка.
14. Факторы, влияющие на биологическую ценность белка.

Тестовые задания

1. Пищевая химия изучает:

- А) строение ферментов;
- Б) состав пищевых систем;
- В) технологию получения каучука;
- Г) изменение состава пищи в технологическом потоке.

2. Задачи пищевой химии:

- А) изучение химического состава пищи;
- Б) изучение закономерностей превращений нутриентов;
- В) изучение состава древесины;
- Г) выявление загрязнений пищевых продуктов.

3. Среднее потребление пищи без воды составляет, г в сутки:

- А) 400; Б) 800;
- В) 1000; Г) 500.

4. Белки пищи являются:

- А) пластическим материалом;
- Б) катализаторами;
- В) составной частью нуклеопротеидов;
- Г) предшественниками ПНЖК.

5. Белки в ЖКТ расщепляются:

- А) до углекислого газа;
- Б) жирных кислот;
- В) спиртов;
- Г) аминокислот.

6. Азотистое равновесие – количество азота, поступившее с пищей, количества, выделенному из организма:

- А) больше;
- Б) равно;
- В) меньше;
- Г) не равно.

7. Методы определения биологической ценности белков:

- А) химические;
- Б) физические;
- В) биологические;

Г) микробиологические.

8. Белок считается полноценным, если аминокислотный скор:

- А) равен 1; Б) больше;
- В) меньше; Г) не равен.

9. Аминокислотный скор лимитирующей аминокислоты:

- А) наименьший;
- Б) наибольший;
- В) отсутствует;
- Г) равен 1.

10. Критерии пищевой ценности белка:

- А) содержание в 100 г продукта;
- Б) биологическая эффективность;
- В) биологическая ценность;
- Г) перевариваемость.

11. Лимитирующая аминокислота определяет усвоение:

- А) всех жиров;
- Б) всего продукта в целом;
- В) всех углеводов;
- Г) всех остальных аминокислот.

12. Химический состав белка, наиболее близкий к идеальному белку, – это белок:

- А) куриного яйца; Б) мяса;
- В) женского грудного молока; Г) рыбы.

13. Виды новых форм белковой пищи:

- А) концентраты; Б) изоляты;
- В) экстракты; Г) вытяжки.

14. Норма потребления белка в сутки г на 1 кг массы тела, составляет:

- А) 5; Б) 1;
- В) 2; Г) 0,5.

15. Функциональные свойства белков:

- А) гелеобразование; Б) гидрофобность;
- В) пленкообразование; Г) гидрофильность.

Тема 2.

ЛИПИДЫ

Липиды – это большая группа природных веществ, разнообразных по химической структуре и физико-химическим свойствам. Общим свойством липидных соединений является способность растворяться в органических растворителях. По химической структуре липиды представляют собой сложные эфиры высших жирных кислот с глицерином или некоторыми другими спиртами. Свободные жирные кислоты встречаются в клетках как минорные компоненты. По строению их можно разделить на две большие группы: простые липиды, или нейтральные жиры, представленные в основном ацилглицеринами, и сложные липиды, к которым относятся липиды, содержащие фосфорную кислоту в моно- и диэфирной связи, так называемые фосфолипиды. К сложным липидам относятся соединения, связанные гликозидной связью с одним или несколькими остатками моносахаридов, или гликолипиды, а также соединения стероидной и изопреноидной природы, в том числе каротиноиды.

Функции липидных соединений весьма разнообразны. Липиды в виде комплексов с белками являются структурными элементами мембран клеток. Они определяют транспорт веществ и участвуют в ряде процессов, связанных с функционированием мембран.

Липиды, выделяющие при окислении вдвое больше энергии, чем углеводы, служат энергетическим материалом для организма. Одновременно они являются запасными веществами, в форме которых депонируется метаболическое топливо. Липиды в связи с ярко выраженными термоизоляционными свойствами сохраняют тепло в организме, предохраняют тело и органы от механического повреждения, выполняют защитную роль. Воск, покрывающий плоды и листья растений, защищает их от избыточного испарения и проникновения микроорганизмов.

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



Рисунок 2.1 – Общая схема выделения и анализа липидов:
 КЧ – кислотное число; ПЧ – перекисное число; ЧО – число омыления; ИЧ – йодное число; ТАГ – триацилглицерины; ДАГ – диацилглицерины; МГ – моноацилглицерины; ЖК – жирные кислоты; ПЛ – полярные липиды

2.1. Методы выделения и определения липидов

2.1.1. 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: смесь хлороформ – метанол (2:1 по объему) – смесь 1 (смесь Фолча); NaCl – 0,73%-й водный раствор;

смесь растворителей: хлороформ – метанол – водный раствор NaCl в соотношении 3 : 48 : 47 – смесь 2.

Методика проведения анализа

Измельченную навеску (300...500 мг) помещают в гомогенизатор тефлоновым или стеклянным пестиком, добавляют 5 объемов смеси 1 и гомогенизируют в течение 5 мин. 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 мин фильтруют через обезжиренный фильтр или центрифугируют при 1000 g в течение 15...20 мин. К центрифугату добавляют 0,73%-й водный раствор хлорида натрия в объеме, составляющем 20% от объема экстракта липидов. Экстракт перемешивают и центрифугируют при 600 g в течение 15...20 мин. 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 мл смеси 2, тщательно 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.

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

Для экстракции общих липидов часто применяют метод Блайя-Дайера.

По этому методу 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 мл) 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 мин добавляют хлороформ до соотношения указанных компонентов 2 : 2 : 0,8. После непрерывного перемешивания в течение 5 мин вводят водный раствор ацетата цинка (20 г/л) 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 мл). 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 мл) 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 мл хлороформа и через 5 мин хлороформ аккуратно декантируют. Операцию повторяют трижды. Колбу с нелипидными компонентами подсушивают в сушильном шкафу 5...10 мин, 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 мл экстракта, г; M_2 – масса нелипидных компонентов, г; V – общий объем экстракта, мл; V_1 – объем экстракта, взятый для анализа (50 мл).

2.1.3. 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%-й этанол.

Методика проведения анализа

Навеску продукта массой 2,00 г из стаканчика для взвешивания переносят в фильтрующую делительную воронку, равномерно смачивают 5 мл этанола, используя стеклянную палочку, и оставляют на 10 мин. Затем добавляют 10 мл 96%-го этанола, еще через 2 мин 20 мл экстрагирующей смеси хлороформ – этанол в соотношении 2 : 1. Воронку закрывают притертой пробкой и встряхивают в течение 1...2 мин, 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 мл экстрагирующей смеси для предотвращения потерь. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя по 20 мл экстрагирующей смеси. Полученные экстракты объединяют и переносят в сухую, предварительно взвешенную круглодонную колбу вместимостью 100 мл, 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

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

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

2.1.4. 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 и помещают в подготовленный патрон из обезжиренной фильтровальной бумаги. Ступку и шпатель протирают несколько раз ватой, сначала сухой, затем смоченной



Рисунок 2.2 –
Аппарат Сокслета

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. 2.2).

Чистую, высушенную и предварительно взвешенную с погрешностью 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 1/3 объема гексаном. Колбу нагревают на водяной или песчаной бане. Экстракцию проводят в течение 2...3 ч 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 105°C до постоянной массы.

Массовую долю свободных липидов в процентах вычисляют по формуле

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

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

2.2. 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 непредельности 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 рисунке 2.1.

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. 2.3).

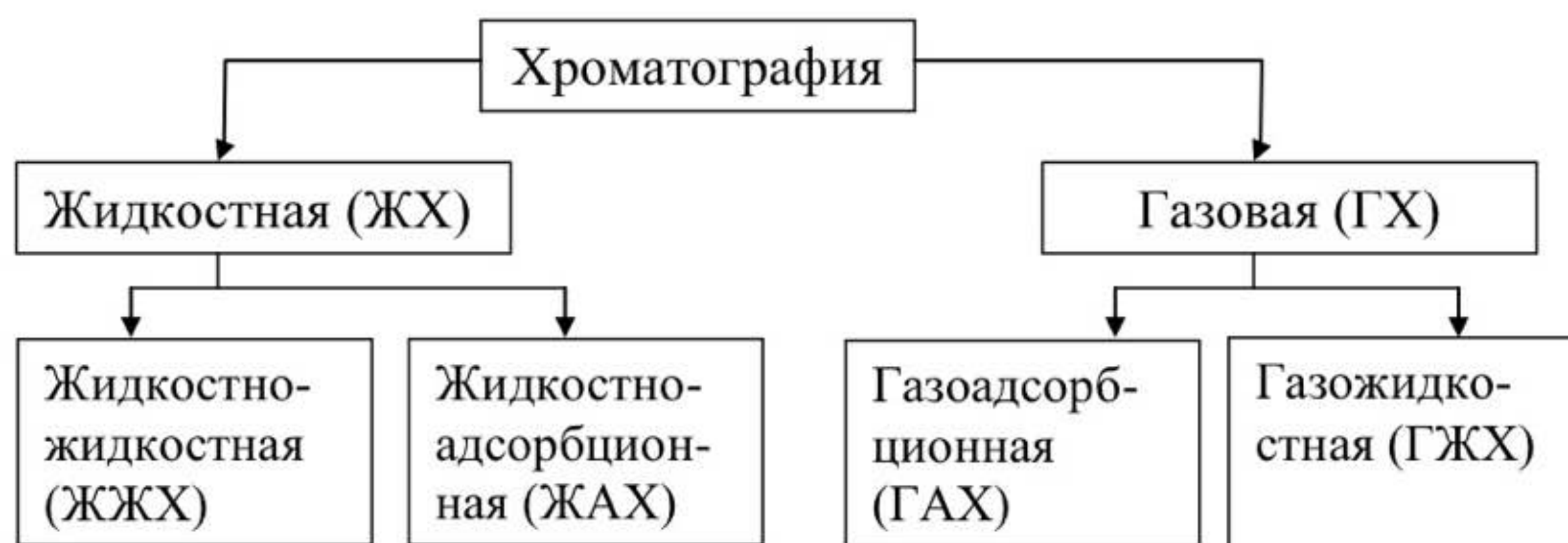


Рисунок 2.3 – Классификация видов хроматографии

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

2.3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 2.3.1

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%-й 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 мл. В колбу приливают 40 мл 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 мл, собирают прибор для прямой перегонки и отгоняют растворитель на водяной бане при температуре 80°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. 2.1).

Таблица 2.1– Результаты экстракции липидов из пищевого объекта

Образец	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%-го раствора.

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

На подготовленную пластину «Силуфол» с помощью микрошприца наносят 1 мкл (10^{-6} мл) 2%-го 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, 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 мин при температуре 60°C. Идентификацию фракций проводят с помощью стандартных веществ-свидетелей или по значению R_f для данной системы растворителей.

Результаты идентификации приводят в таблице (табл. 2.2).

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.

Таблица 2.2 – Идентификация группового состава липидов исследуемых образцов

Липиды	Значение R_f			
	по литературным данным	исследуемых образцов липидов		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
Полярные липиды (глико- и фосфолипиды)	На старте			
Моноацилглицерины	0,02			
1,2-диацилглицерины 1,3-диацилглицерины	0,13...0,21			
Свободные жирные кислоты	0,39			
Триацилглицерины	0,60			
Эфиры стеринов, углеводороды	0,94			

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. 2.3).

Таблица 2.3 – Количественный групповой состав липидов (по данным денситограмм)

Липиды	Относительное содержание групп липидов в исследуемых образцах		
	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Полярные липиды (глико- и фосфолипиды)			
Моноацилглицерины			
1,2-диацилглицерины 1,3-диацилглицерины			
Свободные жирные кислоты			
Триацилглицерины			
Эфиры стеринов, углеводороды			

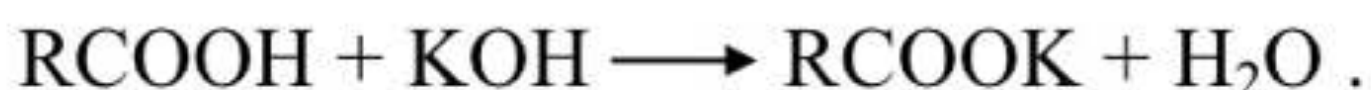
На основании результатов работы делают выводы о содержании липидов в исследуемых пищевых объектах, групповом составе липидов и относительном содержании отдельных групп липидов.

Лабораторная работа 2.3.2 **Исследование физико-химических характеристик пищевых жиров**

Процессы, происходящие в липидах при их хранении и переработке, характеризуются так называемыми константами, или химическими и физическими числами жира. Определение этих констант позволяет контролировать не только качество жиров и масел, но и в какой-то степени его натуральность, регулировать технологические режимы получения продуктов.

Как факторы регулирования производственных процессов широко используются следующие числа жира: кислотное, омыления, эфирное, йодное и перекисное.

Кислотное число характеризует присутствие свободных жирных кислот в жире и выражается количеством мг гидроксида калия, необходимым для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира:



Кислотное число является важнейшим показателем качества пищевых жиров, показывает глубину гидролитического распада и нормируется ГОСТом и техническими условиями. Например, если масло получено из зрелых семян, то свободных жирных кислот в нем мало, а в масле из незрелых семян содержание свободных жирных кислот значительно.

При несоблюдении условий и сроков хранения жиров кислотное число увеличивается, что обусловлено в основном гидролизом триацилглицеринов. Свободные жирные кислоты окисляются быстрее, чем связанные. Таким образом, кислотное число может повышаться в результате окислительного и биохимического прогоркания ненасыщенных жирных кислот. Однако повышенное кислотное число не всегда может служить признаком порчи жира. Часто жиры с высоким кислотным числом не бывают прогорклыми, в то же время кислотное

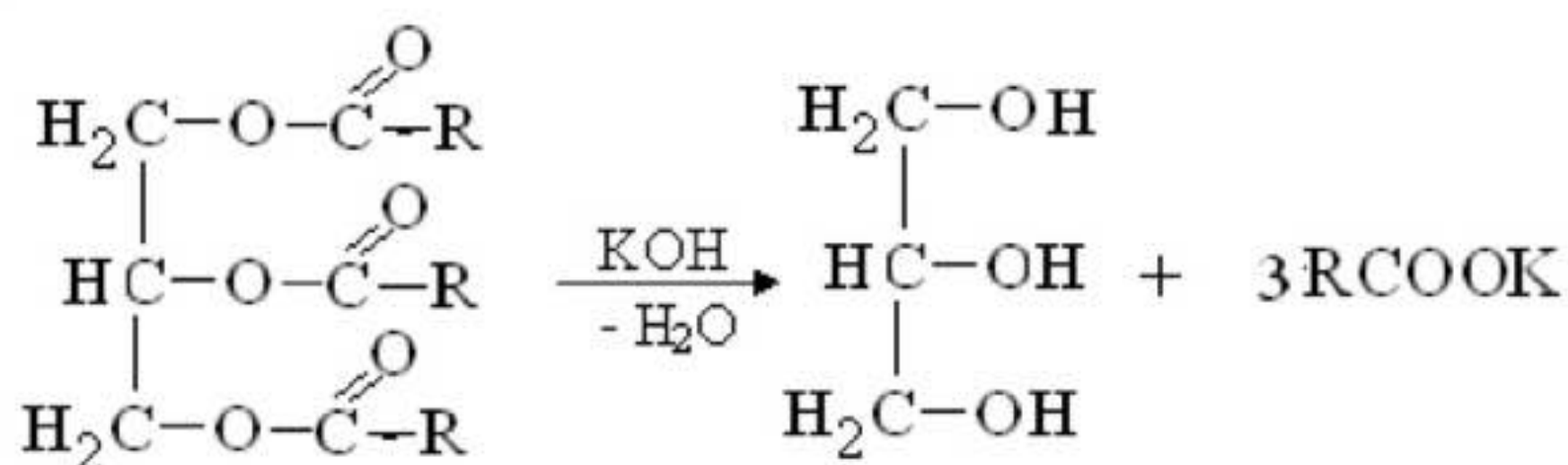
число прогорклых жиров может быть небольшим. Кислотное число нерафинированных масел выше, чем рафинированных.

Кислотное число подсолнечного масла (мг КОН/г):

рафинированного.....	0,40
рафинированного гидратированного.....	1,25
гидратированного 1-го сорта.....	2,25
гидратированного 2-го сорта.....	6,00
нерафинированного высшего	1,50
нерафинированного 1-го сорта.....	2,25
нерафинированного 2-го сорта.....	6,00

Кислотное число соевого рафинированного масла – 0,30...1,50 мг КОН/г.

Число омыления характеризует общее число свободных и связанных жирных кислот в жире и выражается количеством мг гидроксида калия, необходимым для омыления глицеридов и дальнейшей нейтрализации свободных и связанных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира:



Число омыления зависит от молекулярной массы жирных кислот, входящих в глицериды, содержания неомыляемых веществ, свободных жирных кислот, моно- и диацилглицеринов. Число омыления понижается при повышении содержания неомыляемых веществ моно- и диацилглицеринов и повышается при увеличении свободных и низкомолекулярных кислот. Следовательно, число омыления служит показателем окислительной порчи жира.

Число омыления совместно с кислотным числом является показателем степени окислительной порчи жира, сопровождающейся накоплением низкомолекулярных кислот.

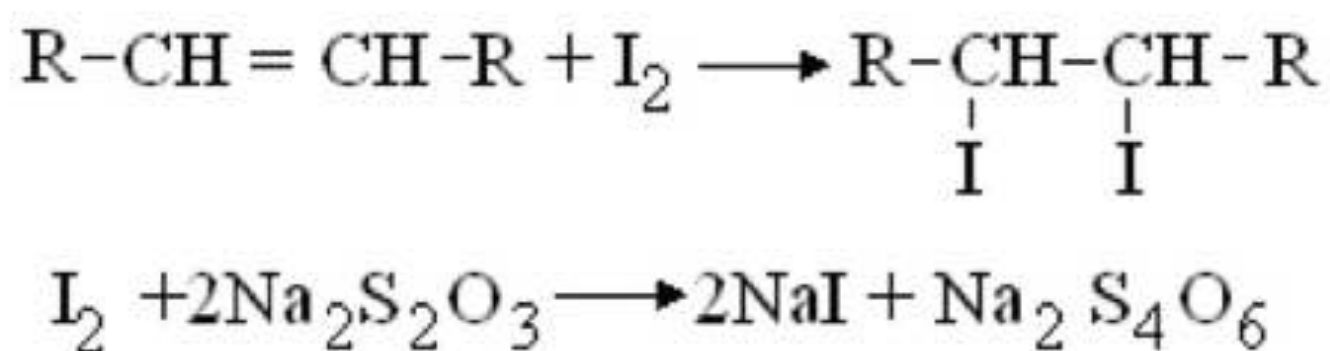
Эфирное число характеризует общее количество сложноэфирных связей в жире и определяется как разность между числом омыления и кислотным числом. Эфирное число выражается количеством мг гидроксида калия, необходимым для нейтрализации связанных жирных кислот в 1 г жира.

Для жиров, не содержащих свободных жирных кислот, значения числа омыления и эфирного числа совпадают. При хранении жиров, сопровождающемся процессами гидролиза и окисления, эфирное число снижается.

Йодное число, или так называемый коэффициент неопределенности, характеризует степень ненасыщенности жира и выражается количеством йода в граммах, которое требуется для полного насыщения жирных кислот, содержащихся в 100 г жира. По величине этого показателя судят о преобладании в жирах насыщенных или ненасыщенных жирных кислот. Чем выше в жире содержание ненасыщенных жирных кислот, тем выше йодное число. Тугоплавкие жиры имеют низкое йодное число, легкоплавкие – высокое.

Йодное число является показателем консистенции сливочного масла и должно учитываться при выборе температурных режимов обработки сливок в процессе их созревания и перемешивания. Этот показатель молочного жира зависит от кормовых рационов, стадии лактации, времени года, породы животного и т.д. Оно повышается летом и понижается зимой и лежит в пределах 28...45 г/100 г. Определять йодное число сливочного масла необходимо при подозрении на наличие в нем примесей растительных масел.

Метод основан на способности йода присоединяться по кратным связям. Непрореагировавший йод оттитровывают тиосульфатом натрия:



Перекисное число служит количественным показателем присутствия первичных продуктов окисления жиров-пероксидов, т.е. окислительных изменений, происходящих в жирах, и выражается количеством йода (в граммах), выделенного пероксидами из 100 г жира.

По величине перекисного числа можно судить только о начальной стадии окисления липидов, на которой образуются пероксиды и гидропероксиды, получившие название первичных продуктов окисления. Они не оказывают существенного влияния на органолептические свойства жира. Содержание пероксидов обычно невысоко, так как они быстро превращаются во вторичные продукты окисления, не содержащие перексидного кислорода. Образующиеся на этой стадии

вторичные продукты – многочисленные насыщенные и ненасыщенные альдегиды и кетоны, многие из которых токсичны и придают жирам соответствующие специфические посторонние привкусы. Так, рыбный привкус вызывают насыщенные и ненасыщенные альдегиды (C₅ - C₁₁), прогорклый вкус – гептаналь.

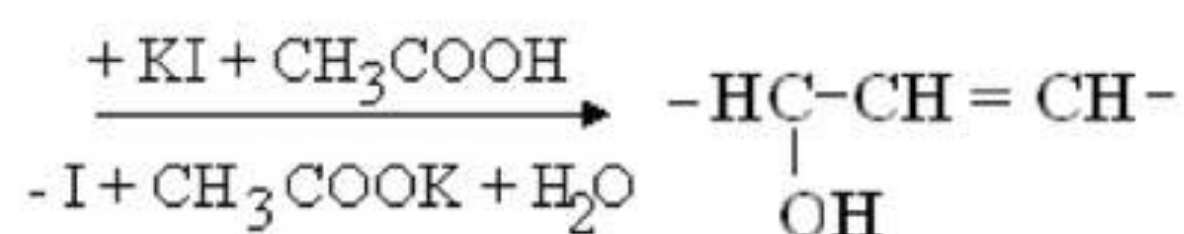
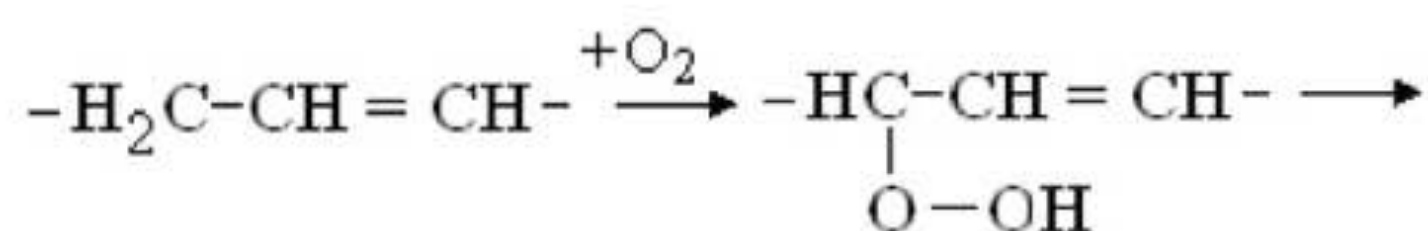
По величине перекисного числа можно судить о свежести жира задолго до появления неприятного вкуса и запаха. Концентрацию пероксидных соединений в жирах следует контролировать, так как они токсичны, способны разрушать жирорастворимые витамины и полиненасыщенные жирные кислоты. Первичные продукты неглубокого окисления липидов образуют плохо усваиваемые организмом комплексные соединения с аминокислотами, снижая тем самым пищевую ценность молочного жира.

В таблице 2.4 приведены данные зависимости степени окисленности жира от величины перекисного числа:

Таблица 2.4 – Зависимость степени окисленности жира от перекисного числа

Перекисное число в 100 г жира	Степень порчи жира
До 0,03	Свежий
0,03...0,06	Свежий, но не подлежит хранению
0,06...0,10	Сомнительной свежести
Более 0,10	Испорченный

Метод определения перекисного числа основан на способности пероксидов в кислой среде окислять йодид калия:



Выделившийся йод оттитровывают тиосульфатом натрия.

Цель работы: освоить методы контроля качества жиров на основе физико-химических показателей.

Реактивы: 0,1 н; 0,5 н спиртовые растворы гидроксида калия; спиртово-эфирная смесь (2:1); 1%-й спиртовой раствор фенолфталеина; 1%-й раствор крахмала (индикатор); 0,1 н раствор йода; 0,1 н; 0,01 н растворы тиосульфата натрия; хлороформ; 95%-й этиловый спирт; ледяная уксусная кислота (95%-я); насыщенный раствор йодида калия; 0,5 н раствор соляной кислоты; 96%-й этиловый спирт; животные и растительные жиры.

Посуда и приборы: колбы для титрования объемом 100 мл со шлифом; мерные цилиндры; пипетки; капельницы; воздушные холодильники; бюретки для титрования; водяные бани.

Методика проведения анализа

Определение кислотного числа жира

В четыре колбы объемом 100 мл поместить по 1 г жира: в первую колбу свежего животного масла, во вторую – прогорклого животного масла, в третью – растительного масла, в четвертую – растительного масла после жарки. В каждую из этих колб добавить по 10 мл спиртово-эфирной смеси (2:1) и осторожно растворить жир при небольшом нагреве. После растворения масла колбы с анализируемой пробой охладить до комнатной температуры и внести в каждую по 1...2 капли спиртового раствора фенолфталеина. Анализируемые растворы осторожно титровать (по одной капле) 0,1 н спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания. Кислотное число (К.Ч, мг/г) определить по формуле

$$\text{К.Ч} = \frac{V_{\text{КОН}} \cdot 5,61 \cdot k}{m},$$

где $V_{\text{КОН}}$ – объем 0,1 н раствора гидроксида калия, пошедшего на титрование навески жира, мл;

5,61 – титр 0,1 н раствора гидроксида калия, мг/мл;

k – поправочный коэффициент к титру 0,1 н раствора гидроксида калия;

m – навеска жира, г.

По кислотному числу рассчитать примерное содержание свободных жирных кислот ($T_{\text{ЖК}}$, %) в жире. Расчет обычно ведут по олеиновой кислоте как наиболее распространенной свободной жирной кислоте в подсолнечном, соевом маслах и кондитерском жире по формуле

$$T_{\text{жк}} = K.Ч \cdot \frac{282,47 \cdot 100}{56,11 \cdot 1000} = 0,5034 \cdot K.Ч,$$

где 56,11 – молекулярная масса гидроксида калия;
 1000 – коэффициент пересчета в граммы;
 100 – коэффициент пересчета в проценты;
 0,5034 – коэффициент пересчета на олеиновую кислоту;
 282,47 – молекулярная масса олеиновой кислоты.

Определение числа омыления жира

В три колбы объемом 100 мл отвесить на аналитических весах по 0,5 г жира. В первую колбу внести свежее сливочное масло, во вторую – прогорклое, в третью – растительное, в четвертую – прокаленное растительное масло. Во все колбы добавить для проведения гидролиза по 10 мл 0,5 н спиртового раствора гидроксида калия (пипеткой), соединить их с воздушными холодильниками и поставить в кипящую водяную баню. По истечении одного часа колбы с анализируемыми пробами вынуть из бани, слегка охладить и отсоединить от холодильников. В каждую колбу с теплым раствором добавить по 1...2 капли раствора фенолфталеина. При этом цвет анализируемого раствора изменится в розовый из-за присутствия гидроксида калия. Избыток гидроксида калия оттитровать 0,5 н раствором соляной кислоты до исчезновения окраски (опыт).

Контрольный опыт проделать с тем же количеством реагентов. Отобрать пипеткой в коническую колбу 10 мл 0,5 н спиртового раствора гидроксида калия и оттитровать его 0,5 н раствором соляной кислоты в присутствии фенолфталеина. По разности объемов, полученных от титрования опыта и контроля, рассчитать число омыления (Ч.о, мг/г) по формуле

$$\text{Ч.о} = \frac{(V_k - V_o) \cdot k_1 k_2 \cdot 28,055}{m},$$

где V_o – количество 0,5 н раствора соляной кислоты, пошедшего на титрование опытного образца, мл;

V_k – количество 0,5 н раствора соляной кислоты, пошедшего на титрование контрольного образца, мл;

m – навеска масла, г;

k_1, k_2 – поправочные коэффициенты к титру растворов гидроксида калия и соляной кислоты соответственно;

28,055 – титр 0,5 н раствора гидроксида калия, мг/мл.

Сравнить полученные в ходе эксперимента результаты со стандартными данными. Число омыления подсолнечного масла 189,9...190,6; пальмового 196,0...210,0; соевого 191,6...192,1; сливочного 220...230.

Число омыления косвенно характеризует среднюю молекулярную массу смеси жирных кислот: чем больше в жире содержится низкомолекулярных кислот, тем выше число омыления. На основании числа омыления (при незначительном кислотном числе) расчетным путем определить среднюю молекулярную массу триацилглицеринов ($M_{ТАГ}$) и среднюю молекулярную массу смеси жирных кислот ($M_{ЖК}$), входящих в состав исследуемого жира, по формулам

$$M_{ТАГ} = \frac{3 \cdot 56,11 \cdot 100}{Ч.о},$$

$$M_{ЖК} = \frac{M_{ТАГ} - 38,01}{3}.$$

Определение эфирного числа жира

Определение эфирного числа жира (Э.ч, мг/г) произвести по формуле

$$Э.ч = Ч.о - К.ч.$$

На основании эфирного числа рассчитать процентное содержание триацилглицеринов ($\Gamma_{ТАГ}$, %) и связанного глицерина (Γ , %) в жире по формулам

$$\Gamma_{ТАГ} = \frac{M_{ТАГ} \cdot Э.ч}{3 \cdot 56,1 \cdot 1000} \cdot 100,$$

$$\Gamma = \frac{92,10 \cdot Э.ч \cdot 100}{3 \cdot 56,11 \cdot 1000} = 0,0547 \cdot Э.ч,$$

где 92,11 – молекулярная масса глицерина;
56,11 – молекулярная масса гидроксида калия;
3 – основность глицерина.

Определение йодного числа жира

В четыре плоскодонные колбы взвесить на аналитических весах по 0,1 г жира. В первую колбу внести свежее сливочное масло, во

вторую – прогорклое, в третью – растительное, в четвертую – прокаленное растительное масло. Во все колбы внести по 10 мл смеси этилового спирта и хлороформа (10 : 1) для растворения навески и слегка подогреть на водяной бане. После охлаждения внести пипеткой по 20 мл 0,1 н раствора йода и оставить полученные растворы в темном месте на 5...10 мин. Растворы оттитровать 0,1 н раствором тиосульфата натрия до перехода коричневой окраски в желтую. Затем добавить индикатор – 1%-го раствора крахмала – и продолжить титрование до исчезновения фиолетовой окраски (опыт).

Контрольный опыт проделать с теми же реагентами, вместо масла в колбу вместимостью 100 мл внести воду, 20 мл 0,1 н раствора йода, 10 мл смеси этилового спирта и хлороформа и титровать 0,1 н раствором тиосульфата натрия в присутствии в качестве индикатора крахмала. Йодное число (Й. Ч., г/100 г) вычислить по формуле

$$\text{Й.Ч} = \frac{(V_k - V_o) \cdot k \cdot 0.01269 \cdot 100}{m},$$

где V_k – количество 0,1 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контрольного образца, мл;

V_o – количество 0,1 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование опытного образца, мл;

0,01269 – титр 0,1 н раствора тиосульфата натрия, г/мл;

m – навеска жира, г;

k – поправочный коэффициент к титру 0,1 н раствора тиосульфата натрия.

Определение перекисного числа жира

На аналитических весах в четыре колбы взвесить по 1 г жира. В первую колбу внести свежее сливочное масло, во вторую – прогорклое, в третью – растительное, в четвертую – прокаленное растительное масло. Жир расплавить на водяной бане и по стенке, смывая следы жира, влить 10 мл спирта и 10 мл ледяной уксусной кислоты. Затем внести 0,5 мл свежеприготовленного насыщенного раствора йодида калия. Смесь тщательно перемешать и оставить на 3 мин в темном месте.

Через 3 мин в колбу влить 5 мл воды, в которую заранее было добавлено 2...3 капли 1%-го раствора крахмала, и титровать выделившийся йод 0,01 н раствором тиосульфата натрия до исчезновения синей окраски (опыт).

Для проверки чистоты реактивов провести параллельно *контрольный опыт* аналогичным способом, только без жира (вместо жира вносят 1 мл воды). К 10 мл спирта и 10 мл ледяной уксусной кислоты добавить 0,5 мл раствора йодида калия, 1 мл воды и оттитровать полученную смесь в присутствии крахмала 0,01 н раствором тиосульфата натрия. Перекисное число (П.Ч, г/100 г) испытуемого жира определить по формуле

$$\text{П.Ч} = \frac{(V_k - V_o) \cdot k \cdot 0.01269 \cdot 100}{m},$$

где V_o – объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование опытного образца, мл;

V_k – объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контрольного образца, мл;

0,00127 – титр 0,01 н раствора тиосульфата натрия, г/мл;

k – поправочный коэффициент к титру 0,01 н раствора тиосульфата натрия;

m – навеска жира, г.

Определить степень порчи жира, сравнив результаты анализа с данными таблицы 2.4.

По результатам анализа сделать заключение о качестве исследуемых жиров, оценить степень их окислительной порчи, результаты оформить в виде таблицы (табл. 2.5).

Таблица 2.5 – Экспериментальные данные о качестве жиров

Показатель жира	Номер образца			
	1	2	3	4
Кислотное число, К.ч, мг/г				
Содержание свободных жирных кислот, $T_{жк}$, %				
Число омыления, Ч.о, мг/г				
Содержание триацилглицеринов, $T_{таг}$, %				
Средняя молекулярная масса триацилглицеринов, $M_{таг}$				
Средняя молекулярная масса жирных кислот, $M_{жк}$				
Эфирное число, Э.ч, мг/г				
Процентное содержание жирных кислот, $T_{жк}$, %				
Перекисное число, П.ч, г/100 г				
Йодное число, Й.ч, г/100 г				

Лабораторная работа 2.3.3
**Определение биологической эффективности
липидов пищевых продуктов**

Биологическая эффективность – показатель качества жировых компонентов пищевых продуктов, отражающий содержание в них полиненасыщенных жирных кислот. Биологическая эффективность липидов, определяемая структурными характеристиками жирных кислот, а также их соотношением между собой и другими пищевыми компонентами, характеризуется как комплексный показатель, учитывающий их воздействие на организм человека.

Полиненасыщенные жирные кислоты являются эссенциальными и не могут синтезироваться в организме. Особое значение имеют полиненасыщенные жирные кислоты (линолевая, линоленовая и арахидоновая), которые входят в состав клеточных мембран и других структурных элементов тканей и обеспечивают нормальный рост, обмен веществ и т.п.

Принято, что на 100 г липидов, необходимых в ежедневном рационе человеку, на долю полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) F_{01} приходится 6 г, на долю насыщенных жирных кислот (НЖК) F_{02} 20 г, на долю олеиновой кислоты F_{03} 35 г.

С целью использования этих данных для расчета биологической эффективности липидов различных продуктов питания введено понятие **«идеальный» липид**, представляющий собой гипотетический продукт, содержащий ПНЖК, НЖК и олеиновую кислоту в необходимой пропорции, коэффициент биологической эффективности которого равен 1.

Подобно химическому скору для белков, скор для липидов определяем как отношение количества конкретной фракции в исследуемом растворе образца к количеству этой же фракции в «идеальном» липиде по формуле

$$C_{ij} = \frac{F_{ij}}{F_{0j}}, \quad j = 1 - 3,$$

где C_{ij} – скор для липидов по каждой конкретной фракции; F_{ij} – содержание фракций в исследуемом липиде, г; F_{0j} – содержание этих же фракций в идеальном липиде, г.

Коэффициент использования липидов (коэффициент биологической эффективности) может быть рассчитан по формуле

$$f_i = \frac{3C_{ik}}{\sum_{j=1}^3 C_{ij}},$$

где f_i – коэффициент биологической эффективности липидов;

C_{ik} – скор по минимальному уровню любой из фракций (с учетом усвояемости);

C_{ij} – скор для липидов по каждой фракции.

Примем аксиомное положение об усвоении липидов по минимальному уровню любой из фракций, т.е. если ($C_{i1} < C_{i2} < C_{i3}$), то все жирно-кислотные фракции усваиваются на уровне C_{i1} , а избыток каждой фракции, равный ($C_{i2} - C_{i1}$) и ($C_{i3} - C_{i1}$), депонируется в организме или поступает на его энергетические нужды. Следовательно, в расчетах будет использована величина C_{ik} – минимальная.

Для предложенного условного эталона $C_{ik} = C_{i1} = C_{i2} = C_{i3}$, а коэффициент биологической эффективности липидов $f = 1$.

Пример

Рассчитать коэффициент биологической эффективности липидов жировой ткани свинины.

Расчет

1. В таблицах химического состава пищевых продуктов находим содержание фракции $F_{02} = 33,34$; $F_{01} = 10,41$; $F_{03} = 38,7$ в г на 100 г липидов жировой ткани. В таблицах содержание липидов приведено в г на 100 г продукта. Поэтому необходимо сделать пересчет в г на 100 г липидов.

F_{i1} 10,41 г ПНЖК содержится в 91,0 г липидов;

X г ПНЖК содержится в 100 г липидов X = 11,44 г;

F_{i2} 33,34 г НЖК содержится в 91,0 г липидов;

X г НЖК содержится в 100 г липидов X = 33,67;

F_{i3} 38,7 г олеиновой кислоты 91,0 г липидов;

X г олеиновой кислоты 100 г липидов X = 42,53 г.

2. Рассчитаем скоры для фракций липидов:

$$C_{i1} = \frac{F_{i1}}{F_{01}} = \frac{11,44}{6,0} = 1,907;$$

$$C_{i2} = \frac{F_{i2}}{F_{02}} = \frac{36,67}{20} = 1,834 ;$$

$$C_{i3} = \frac{F_{i3}}{F_{03}} = \frac{42,53}{35,0} = 1,216 .$$

3. В соответствии с положением об усвоении липидов по минимальному уровню любой из фракций рассчитываем коэффициент биологической эффективности липидов жировой ткани свинины:

$$f_i = \frac{3C_{ik}}{\sum_{j=1}^3 C_{ij}} , \quad k = 1 - 3 .$$

Минимальный скор, исходя из расчетов, составил $C_{i3} = 1,216$ для фракции F_{i3} , тогда

$$F_3 = \frac{3C_{i3}}{C_{i1} + C_{i2} + C_{i3}} = \frac{3 \cdot 1,216}{4,957} = 0,735 .$$

Результаты расчетов сводим в таблицу 2.6.

Таблица 2.6 – Расчет коэффициента эффективности липидов (на примере жировой ткани свинины)

Липиды и их фракции	Жировая ткань свинины, г на 100 г продукта	Жировая ткань свинины, г на 100 г липидов		Идеальный липид, г на 100 г липидов		Жировая ткань липидов (усвояемая часть) C_{ik}
		F_{ik}	C_{ik}	F_{ok}	C_{ok}	
Сумма липидов, %	91,00	100,0	-	100,0	-	-
Содержание НЖК	33,84	36,67	1,83	20,0	1,0	1,22
Содержание олеино- вой кислоты	38,7	42,53	1,22	35,0	1,0	1,22
Содержание ПНЖК	10,42	11,44	1,91	6,0	1,0	1,22
Сумма скоров			4,96			3,65

Задание

Рассчитать коэффициент биологической эффективности липидов продуктов (согласно индивидуальному заданию). Расчеты свести в таблицу.

Контрольные вопросы

1. Дать характеристику липидам. Роль липидов в живой клетке.
2. Классификация липидов.
3. Какие группы липидов относятся к простым липидам?
4. Сложные липиды. Их отличие от простых липидов.
5. Приведите формулы и названия эссенциальных жирных кислот, их роль в питании человека.
6. Физико-химические характеристики жиров. Какие процессы можно контролировать с помощью кислотного числа?
7. Функции полиненасыщенных жирных кислот в организме.
8. Дать характеристику «идеальному» или «эталонному» липиду по шкале ФЛО/ВОЗ.
9. Приведите определение «биологической эффективности» пищевых продуктов. Как влияет на этот показатель жирнокислотный состав жира, входящего в продукт?
10. Суточная норма потребления липидов человеком.
11. Каково оптимальное соотношение животных и растительных жиров в питании?

Тестовые задания

1. Физиологическая роль липидов:

- А) источник энергии;
- Б) источник эндогенной воды;
- В) каталитическая;
- Г) защитная.

2. Ассортимент пищевых жиров:

- А) молочный жир;
- Б) вазелиновой масло;
- В) растительное масло;
- Г) животный жир.

3. Физико-химические показатели качества жира:

- А) йодное число;
- Б) перевариваемость;
- В) кислотное число;
- Г) число омыления.

4. Показатели пищевой ценности липидов:

- А) перевариваемость;
- Б) усвояемость;
- В) наличие высших жирных кислот;
- Г) незаменимость.

5. Биологическая роль ПНЖК:

- А) оказывают нормализующее действие на стенки кровеносных сосудов;
- Б) влияют на обмен холестерина;
- В) повышают иммунитет;
- Г) участвуют в синтезе аминокислот.

6. ПНЖК содержат продукты:

- | | |
|------------------------|------------|
| А) растительные масла; | Б) рыба; |
| В) животные масла; | Г) фрукты. |

7. Сбалансированным жирнокислотным составом считается состав, в котором содержится %:

- А) ПНЖК – 10–20, МНЖК – 50–60, НЖК – 30;
- Б) ПНЖК – 30, МНЖК – 40–50, НЖК – 30;
- В) ПНЖК – 40, МНЖК – 20–30, НЖК – 40;
- Г) ПНЖК – 20, МНЖК – 70, НЖК – 10.

8. Биологическая эффективность – показатель качества жировых компонентов продуктов, отражающих содержание в них:

- А) МНЖК;
- Б) ПНЖК;
- В) ВЖК;
- Г) углекислого газа.

9. 100 г идеального липида содержит г.:

- А) 20 – НЖК, 6 – ПНЖК, 35 – олеиновой кислоты;
- Б) 10 – НЖК, 2 – ПНЖК, 15 – олеиновой кислоты;
- В) 40 – НЖК, 1 – ПНЖК, 30 – олеиновой кислоты;
- Г) 30 – НЖК, 3 – ПНЖК, 25 – олеиновой кислоты.

10. Выделяется при окислении 1 г жира ккал:

- | | |
|-------|--------|
| А) 1; | В) 9; |
| Б) 3; | Г) 10. |

11. Сложными липидами являются:

- | | |
|----------------------|-----------------|
| А) триацилглицериды; | Б) воска; |
| В) фосфолипиды; | Г) гликолипиды. |

12. Усвояемость жира составляет %, если его температура плавления 50...60 градусов:

- А) 10...20;
- Б) 70...80;
- В) 30...40;
- Г) 40...50.

13. Усвояемость жира составляет %, если его температура плавления 37...45 градусов:

- А) 10...20;
- Б) 70...80;
- В) 30...40;
- Г) 90.

14. Усвояемость жира составляет %, если его температура плавления меньше температуры тела человека:

- А) 10...20;
- Б) 70...80;
- В) 93...98;
- Г) 40.

15. Содержание холестерина в крови человека не должно быть более ...мг%:

- А) 100...120;
- Б) 150...200;
- В) 30...40;
- Г) 90.

Тема 3.

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). Углеводы являются источником энергии, служат пластическим материалом для ферментов, мукополисом, входят в состав мембран клеток, участвуют в регуляции защитных функций организма, выполняют регуляторную функцию.

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.

Глюкоза является составной единицей большинства ди- и полисахаридов. Она наиболее легко- и быстроусвояемый сахар. Источниками глюкозы являются фрукты, мед, плоды. Глюкоза является непосредственным источником энергии, ее избыток легко превращается в жир. Обмен глюкозы в организме человека связан с гормоном поджелудочной железы – инсулином. Глюкоза откладывается на временное хранение в виде гликогена в печени и скелетных мышцах. Велика роль глюкозы для центральной нервной системы.

Фруктоза легко усваивается организмом. Около 70% ее задерживается в печени, где превращается в гликоген. Фруктоза представляет идеальный сахар при нарушении жирового обмена. Источниками фруктозы являются мед, хурма, арбуз, смородина и другие.

Сахароза (тростниковый сахар, свекловичный сахар) состоит из остатков глюкозы и фруктозы. Сахароза – невосстанавливающийся сахар, широко применяемый в питании. Она кристаллизуется без воды в виде больших моноклинических кристаллов. Сахароза сбражи-

вается дрожжами, а при нагревании выше температуры плавления (160...186°C) карамелизуется, теряя при этом воду. Образующиеся продукты (карамелан, карамелен) под названием «колер» используют при производстве напитков, в коньячном производстве для окраски готовых продуктов, в производстве кондитерских изделий. Большое содержание сахарозы обнаружено в сахарной свекле и сахарном тростнике

Лактоза (молочный сахар) состоит из остатков галактозы и глюкозы и обладает восстанавливающими свойствами. Источником лактозы является молочная сыворотка. Лактоза не участвует в спиртовом брожении, но под влиянием молочнокислых дрожжей гидролизует с последующим сбраживанием образовавшихся продуктов в молочную кислоту.

Мальтоза – солодовый сахар, молекула которой состоит из двух остатков глюкозы. Большое количество мальтозы содержится в солоде и солодовых экстрактах. Она образуется при неполном гидролизе крахмала разбавленными кислотами или амилалитическими ферментами. Мальтоза является одним из основных компонентов крахмальной патоки, широко применяемой в пищевой промышленности.

Крахмал – полисахарид, являющийся основным источником энергии. Представляет смесь полимеров двух типов, построенных из остатков глюкопиранозы: амилозы и амилопектина, содержание которых зависит от вида культуры и составляет 18...25% и 75...82% соответственно.

Амилоза – линейный полимер, построенный из остатков глюкопиранозы.

Амилопектин – полимер, содержащий 5000...6000 остатков глюкозы.

В процессе технологической обработки под воздействием влаги, температуры крахмал способен адсорбировать воду, набухать, клейстеризоваться, подвергаться деструкции. Под действием ферментов или кислот при нагревании крахмал присоединяет воду и гидролизуется. При полном гидролизе образуется глюкоза.

Гликоген (животный крахмал) состоит из остатков глюкозы, присутствует в некоторых растениях (зерна кукурузы). По химическому строению схож с амилопектином, но более разветвлен, и его молекула имеет более компактную упаковку, построенную из остатков глюкопиранозы. Гликоген хорошо растворим в воде, но при охлаждении его рас-

творы не образуют клейстер. Подвергается гидролизу с образованием глюкозы.

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 изменяются состав углеводов, их структура и содержание. Важную роль в функционировании желудочно-кишечного тракта выполняют пищевые волокна, источником которых является растительное сырье. Они оказывают нормализующее действие на микрофлору толстого кишечника, способны адсорбировать воду, желчные кислоты, стерины, выводить из организма тяжелые металлы и радионуклеотиды.

Среднесуточная норма употребления углеводов составляет 400...500 г. Оптимальным считается 50...65% углеводов от суточной калорийности рациона. При больших физических нагрузках доля углеводов увеличивается до 700 г/сут. В суточном рационе должно содержаться 20...25 г пищевых волокон, в том числе 9...10 г клетчатки, 5...6 г пектиновых веществ.

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 рисунке 3.1.



Рисунок 3.1 – Схема анализа углеводов пищевого сырья и продуктов питания

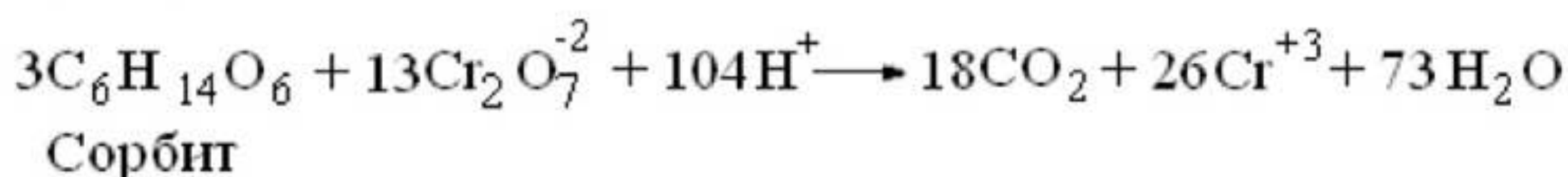
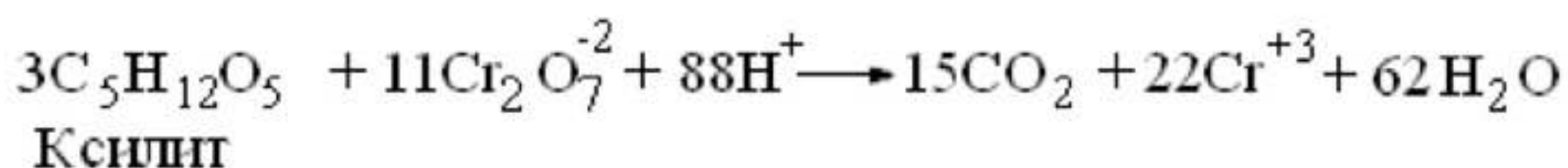
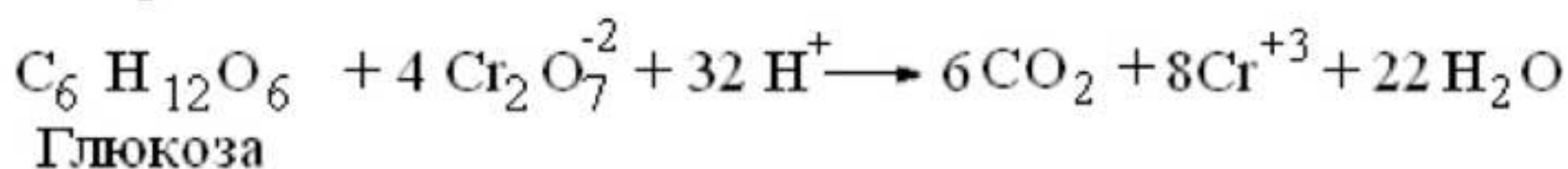
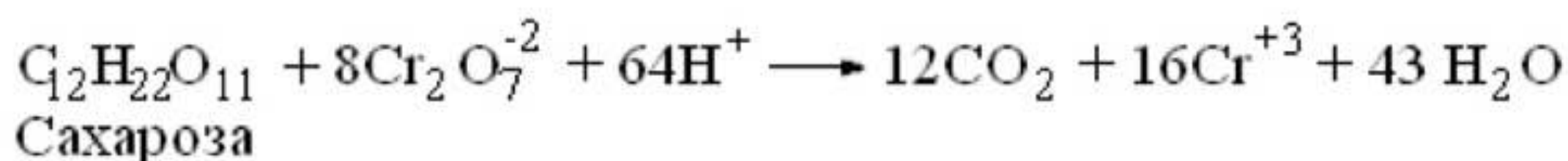
3.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 3.1.1

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/мл (стандартный раствор сахарозы); 1%-й раствор дихромата калия (основной реактив) (прил. 4); серная кислота – плотность 1,84 г/см³; 0,5 М раствор сульфата цинка; 1 М раствор гидроксида натрия.

Методика проведения анализа

Построение градуировочного графика

В 6 мерных колб вместимостью 100 мл вносят по 25 мл раствора дихромата калия. Из бюретки последовательно добавляют 0, 2, 4, 6, 8 и 20 мл стандартного раствора сахарозы. Затем во все колбы из бюретки приливают дистиллированную воду до объема 50 мл, (т. е. добавляют 25, 23, 21, 19, 17 и 5 мл воды). Получают серии растворов, содержащих соответственно 0, 8, 16, 24, 32 и 80 мг сахарозы в 100 мл.

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 мл» используют среднее значение оптической плотности (табл. 3.1).

Таблица 3.1 – Данные для построения градуировочного графика

Количество сахарозы	Концентрация сахарозы, мг/100 мл	Оптическая плотность			
		A ₁	A ₂	A ₃	A _{ср}
0	0				
2	8				
4	16				
6	24				
8	32				
20	80				

Подготовка проб для анализа

Анализируемый образец измельчают в ступке. Затем готовят водную вытяжку объекта исследования. Примерные навески для различных пищевых объектов приведены в таблице 3.2. Навеску с точностью до 0,01 г переносят в мерную колбу вместимостью, определенной по таблице 3.2 в зависимости от взятой пробы.

Навеску растворяют в дистиллированной воде, нагретой до 60°C.

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.

Б. Если в изделии находятся вещества, не растворимые 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°C (для объектов, содержащих крахмал, до 50°C). При этой температуре выдерживают колбу в течение 15 мин, периодически перемешивая жидкость. За это время практически все сахара переходят в раствор. Охладив раствор, осаждают «мешающие несакхара», прибавляя к нему 5 мл 0,5 М раствора ZnSO₄ и 2,5 мл 1 М раствора КОН или NaOH. Раствор доводят до метки и фильтруют.

Таблица 3.2 – Примерные навески пищевых продуктов для определения содержания сахаров

Объект	Навеска, г	Вместимость мерной колбы для приготовления вытяжки, мл	Объем на определение, мл	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

Определение общего сахара

В мерную колбу вместимостью 100 мл отбирают цилиндром 25 мл раствора дихромата калия, 10 мл прозрачного фильтрата и 15 мл воды, нагревают в течение 10 мин на кипящей водяной бане, охлаждают, добавляют до метки воду, перемешивают. Полученным раствором заполняют кювету и определяют оптическую плотность так же, как и при снятии градуировочного графика.

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

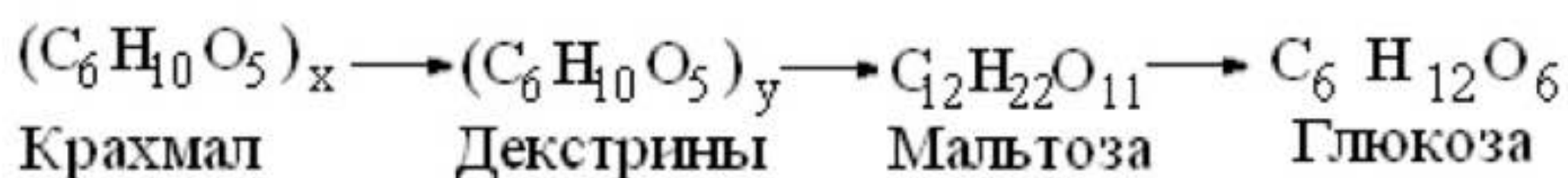
Содержание общего сахара X (%) в анализируемом продукте вычисляют по формуле:

$$X = \frac{gV_1 \cdot 100}{V_2 m \cdot 1000},$$

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 3.1.2 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 мл); 10%-й раствор серной кислоты; 0,1 н. раствор йода в KI; пластинки «Силуфол» для тонкослойной хроматографии; разделяющая система растворителей: н-бутанол – ледяная уксусная кислота – дистиллированная вода в соотношении 60:15:25; реагент для проявления пластинок: смесь н-бутанола (60 мл) – воды (25 мл) – ледяной уксусной кислоты (15 мл) – фосфорной кислоты (10 мл) – анилина (1 мл) – дифениламина (2 г).

Методика проведения анализа

В мерную пробирку помещают 2 мл крахмального клейстера и 6 капель раствора серной кислоты. Содержание пробирки встряхивают и ставят в стакан вместимостью 50 мл с кипящей водой. Каждые 2 мин 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 окрашивание. 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: н-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 раствора теля) 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: н-бутанол – вода – уксусная кислота – фосфорная кислота – анилин – дифениламин в количественном соотношении: 60 мл – 25 мл – 15 мл – 10 мл – 1 мл – 2 г. Пластинки снова высушивают и проявляют в термостате при температуре 120°C в течение 5 мин.

Идентификацию продуктов гидролиза проводят с помощью свидетелей и по значениям R_f (табл. 3.3).

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 3.4.

Таблица 3.3 – Результаты тонкослойной хроматографии

Углевод	Цвет пятна	Значение R_f	
		теоретическое	расчетное
Моносахариды:			
глюкоза	Оливково-серое	0,36	
фруктоза	Красное	0,37	
ксилоза	Зеленое	0,45	
Дисахариды:			
мальтоза	Серо-голубое	0,25	
лактоза	Оливково-серое	0,20	
сахароза	Коричневое	0,28	
Исследуемое вещество			

Таблица 3.4 – Результаты хроматографического анализа продуктов кислотного гидролиза крахмала

№ п/п	Компонент 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.

Лабораторная работа 3.1.3

Выделение пектина и исследование его свойств

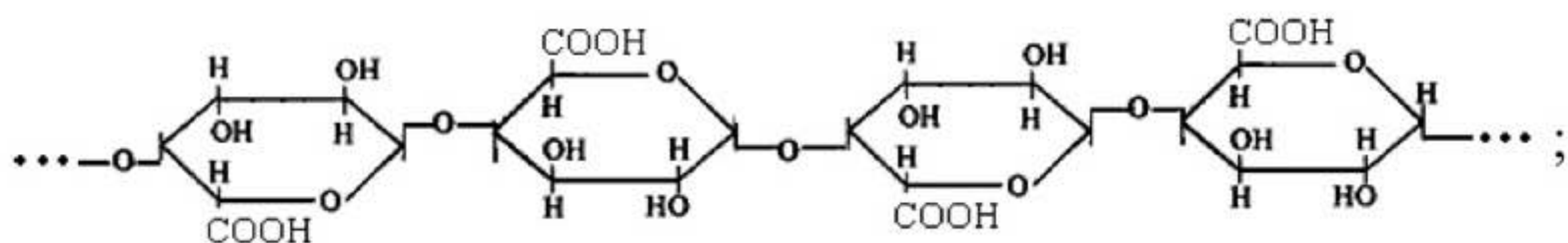
Пектиновые вещества представляют собой полимерные соединения с молекулярной массой от 10...100 тысяч дальтон, широко

распространенные в растениях. Они являются важным углеводным компонентом клеточной стенки и межклеточного пространства растений. В растительных клетках находится две основные формы пектиновых веществ: пектин растворимый (гидропектин) и нерастворимый (протопектин). Протопектин представляет собой прочный комплекс с целлюлозой.

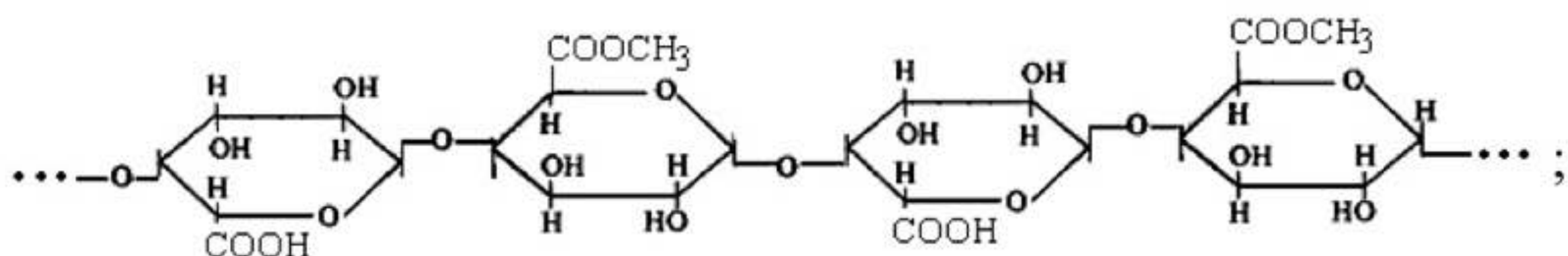
Основной остов молекулы пектина построен из остатков D-галактуроновой кислоты, связанных между собой α (1 \rightarrow 4) – гликозидными связями, частично метоксилированных по шестому углеродному атому. Степень этерификации пектинов составляет 37...90%. Они представляют собой растворимые коллоидные вещества, обладающие водопоглощающей способностью.

По физико-химическим свойствам пектиновые вещества в зависимости от их растворимости и степени метоксилирования галактуроновой кислоты делятся на кислоты:

- *пектовую* (полностью деметоксилированная полигалактуроновая кислота, малорастворимая в воде)



- *пектиновую* (высокомолекулярная полигалактуроновая кислота, часть карбоксильных групп которой этерифицирована метиловым спиртом, хорошо растворимая в воде)



- *пектаты* – соли пектовой кислоты;
- *пектины* – водорастворимые вещества, свободные от целлюлозы и состоящие из полигалактуроновой кислоты, карбоксильные группы которой в различной степени метоксилированы и нейтрализованы ионами кальция;
- *пектинаты* – соли пектинов;
- *пектиновые вещества* – физические смеси пектинов с сопутствующими веществами (пентозанами и гексозанами);

- *протопектин* – условное название соединений, характеризующихся в основном нерастворимостью в воде и способностью при осторожном гидролизе образовывать пектиновые кислоты. Состоит из сети пектиновых цепей, образованных в результате соединения ионов многовалентных металлов с неэтерифицированными карбоксильными группами, с помощью эфирных мостиков с фосфорной кислотой.

Наибольшее количество пектиновых веществ находится в плодах и корнеплодах. Они предохраняют их от высыхания, влияют положительно на засухоустойчивость и обеспечивают тургор. При созревании и хранении плодов нерастворимые формы пектина переходят в растворимые. Растворимые пектиновые вещества содержатся в клеточном соке. Получают пектиновые вещества из яблочных выжимок, свеклы, корзинок подсолнечника, цитрусовых и других отходов переработки растительного сырья.

Номенклатура пектинов основана на степени метоксилирования карбоксильных групп полигалактуроновой цепи. В зависимости от количества метоксильных групп и степени полимеризации различают высоко- (этерифицировано более 50% карбоксильных групп) и низкоэтерифицированные (этерифицировано менее 50% карбоксильных групп) пектины.

Высокоэтерифицированные пектины способны образовывать гели в присутствии кислот и сахара при соблюдении определенного соотношения. Низкоэтерифицированные пектины способны образовывать гели лишь в присутствии ионов кальция. На этом основано их использование в качестве студнеобразующего вещества в кондитерской и консервной промышленности для производства мармелада, пастилы, желе и джемов, а также в хлебопечении, сыроделии.

Цель работы: провести экстракцию и качественный анализ растворимого пектина.

Реактивы: 0,1 н раствор гидроксида натрия; 1 н раствор уксусной кислоты; 1%-й раствор ацетата свинца; растворы Фелинг I и Фелинг II; пектинсодержащее сырье.

Посуда и приборы: конические колбы объемом 100 мл; стеклянные воронки; капельницы; фильтровальная бумага; пробирки; пипетки; водяная баня; центрифуга; термостат.

Методика проведения анализа

Выделение растворимого пектина

К 40 г свежеразмолотого на миксере пектинсодержащего материала (яблоки, сахарная свекла, морковь, лимонные корки) добавить 40 мл теплой воды (не выше 45°C), поместить в термостат и выдерживать при периодическом встряхивании и температуре 40°C в течение 30 мин. Полученный раствор пектина отфильтровать, к осадку повторно добавить 25 мл теплой воды и повторить экстракцию. Новую порцию экстракта отфильтровать, фильтраты объединить.

Доказать нередуцирующие свойства пектинов с помощью реактива Фелинга. Для этого к 5...6 каплям раствора растворимого пектина добавить 5...6 капель смеси растворов Фелинг I и Фелинг II до образования легкой не исчезающей мути и погреть на кипящей водяной бане 2...3 мин. Объяснить изменение окраски анализируемого раствора, написать уравнение реакции.

Щелочной гидролиз по эфирной и гликозидной связям

Щелочной гидролиз растворимого пектина по сложноэфирной связи ведут при комнатной температуре. Для этого в коническую колбу внести 5 мл раствора растворимого пектина и прилить 20 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия. Раствор оставить на 30 мин для достижения полноты реакции (написать уравнение реакции образования пектата натрия). Приблизительно 2 мл раствора щелочного гидролизата поместить на 30 мин в кипящую водяную баню для прохождения гидролиза по гликозидным связям до образования галактуроновой кислоты. Доказать восстанавливающие свойства галактуроновой кислоты с помощью реактива Фелинга. Написать уравнение реакций.

Качественная реакция на пектин

К оставшемуся от предыдущего опыта щелочному гидролизату растворимого пектина прилить 5 мл 1 н раствора уксусной кислоты и перевести пектатнатрия в свободную пектовую (полигалактуроновую) кислоту, добавить 1 мл 1%-го раствора ацетата свинца и нагреть на кипящей водяной бане. При наличии полигалактоуроновой кислоты наблюдается образование кирпично-красного осадка пектата свинца.

Написать уравнение реакции.

Контрольные вопросы

1. Методы анализа, используемые для определения углеводов
2. Что представляет собой функциональный анализ углеводов?
3. На какой реакции основан метод определения общего сахара? Характеристика используемого прибора при определении углеводов. Принцип построения градуировочного графика.
4. Какие углеводы относятся к неусваиваемым углеводам и какие методы анализа используются для их определения?
5. Какие полисахариды относятся к усваиваемым углеводам? Назовите методы их определения.
6. Сущность химических методов определения моно- и олигосахаридов.
7. Дать характеристику пищевым волокнам. Сущность метода определения пищевых волокон в пищевых продуктах.
8. Сущность хроматографического метода анализа углеводов. Общая схема газохроматографического анализа сахаров.

Тестовые задания

1. Физиологическая роль углеводов в организме человека:

- А) входят в состав мембран клеток;
- Б) являются источником эндогенной воды;
- В) выполняют регуляторную функцию;
- Г) являются источником энергии.

2. Жирообразование усиливается при избыточном употреблении:

- | | |
|--------------|--------------|
| А) глюкозы; | В) фруктозы; |
| Б) сахарозы; | Г) лактозы. |

3. Пищевые волокна являются незаменимым фактором питания?

- | | |
|--------|---------|
| А) да; | Б) нет. |
|--------|---------|

4. Роль пищевых волокон в организме человека:

- А) источник энергии;
- Б) предотвращают образование каловых камней;
- В) выводят тяжелые металлы;
- Г) нормализуют микрофлору толстого кишечника.

5. Норма потребления углеводов, г в сутки:

- | | |
|---------------|---------------|
| А) 600...700; | В) 400...500; |
| Б) 700...800; | Г) 200...300. |

6. Компоненты пищевых волокон:

- А) пектиновые вещества;
- Б) аминокислоты;
- В) целлюлоза;
- Г) лигнин.

7. Пищевые волокна содержатся:

- | | |
|------------|-------------|
| А) в мясе; | В) тыкве; |
| Б) масле; | Г) пшенице. |

8. Пониженное потребление углеводов необходимо:

- | | |
|-------------------|----------------------|
| А) при дистрофии; | В) лейкемии; |
| Б) ревматизме; | Г) сахарном диабете. |

9. Углеводы при хранении и переработке подвергаются:

- | | |
|------------------|------------------|
| А) гидролизу; | В) этерификации; |
| Б) дегидратации; | Г) денатурации. |

10. Относительная сладость характеризуется по отношению к сладости:

- | | |
|--------------|-------------|
| А) фруктозы; | В) глюкозы; |
| Б) сахарозы; | Г) рамнозы. |

11. Реакция меланоидинообразования – это реакция взаимодействия:

- А) аминокрупп аминокислот с гликозидными гидроксилами сахаров;
- Б) аминокислот с триацилглицеридами;
- В) аминокислот с нуклеиновыми кислотами;
- Г) аминокрупп аминокислот с нередуцирующими сахарами.

12. Значение реакции меланоидинообразования:

- А) уменьшает усвоение белка;
- Б) повышает усвоение белка;
- В) формирует органолептические свойства продукта;
- Г) не влияет на органолептические свойства продукта.

13. Реакция Майера протекает при температуре:

- | | |
|-------------|---------------|
| А) 0...10; | В) 40...100; |
| Б) 10...30; | Г) более 100. |

Тема 4.

ВИТАМИНЫ

4.1. 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. Их относят к незаменимым факторам питания.

Существование витаминов и их необходимость для жизни человека и животных впервые были доказаны в 1870 году русским ученым В. И. Луниным, работавшим в Тартуском университете. В начале XX века 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. В природе источником витаминов являются растения и микроорганизмы. *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 В₁₂) 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 В₁), рибофлавин (витамин В₂), 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.

Витамин С (аскорбиновая кислота) является одним из важнейших факторов питания. Характерной особенностью витамина является его способность обратимо окисляться и восстанавливаться. Термообработка при приготовлении пищи ускоряет окисление витамина С. На содержание витамина С большое значение оказывает продолжительность хранения исходного сырья. Свежие овощи и фрукты всегда богаче витамином С. Недостаток или отсутствие витамина С в пище приводят к тяжелому заболеванию, известному под названием цинги. Суточная доза витамина С для взрослого человека составляет 50 мг. Большое количество витамина С содержат плоды шиповника, черной смородины, перец, укроп, петрушка.

Витамины группы В – тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, холин, пиридоксин, фолиевая кислота, биотин, цианкобаламин, мезоинозит, парааминобензойная кислота, оротовая кислота, пангамовая кислота. В эту группу входит более десяти витаминов, различных по биохимическим свойствам. Витамины группы В входят в состав многих ферментов. При их недостатке снижается способность организма к образованию антител в сыворотке крови, приводящая к снижению иммунитета, нарушаются биохимические процессы. Витамины группы В тесно связаны с функцией желез внутренней секреции и нервной системы. Особенно тесно связана биологическая активность витаминов группы В с обеспеченностью белком и незаменимыми аминокислотами, другими факторами питания, а также взаимодополняющее действие (или антагонизм) разных витаминов. Источниками витаминов группы В являются дрожжи, печень, куриные яйца, мясные, молочные продукты.

Витамины группы А являются производными каротина. Они не растворимы в воде, но растворяются в различных органических растворителях и жирах. Витамины группы А образуются и встречаются исключительно в тканях животных и продуктах животного происхождения. В растениях они отсутствуют, однако образуются из каротиноидов, которые широко распространены в растениях, поэтому каротин является провитамином А.

Витамин А в чистом виде легко разрушается при окислении и при термообработке. Отсутствие в пище витаминов группы А отражается на росте, понижении иммунитета, ослаблении зрения, назы-

ваемом куриной слепотой. Основными источниками витамина А являются листовая зелень, морковь, томаты.

Витамины группы Д встречаются только в животном организме. В растениях содержатся стеролы, из которых под влиянием ультрафиолетовых лучей образуются витамины группы Д, поэтому эти стеролы называют провитаминами Д (например, эргостерол). Недостаточное содержание этих витаминов приводит к возникновению рахита.

Витамины группы Е (токоферолы) синтезируются только в растениях. Содержатся в семенах (зернах пшеницы и риса) и маслах (подсолнечном, кукурузном, хлопковом, рисовом, конопляном, пальмовом и других), а также в зеленых частях растений (салате, шпинате).

Витамины группы К представляют собой производные нафтохинонов. Витамины группы К широко распространены в продуктах растительного и животного происхождения. Лучшими источниками витаминов группы К являются зеленые части растений.

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).

4.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 4.2.1

Жирорастворимые витамины.

Определение массовой доли β -каротина

Цель работы: оценить устойчивость β -каротина в процессе тепловой обработки растительного сырья.

Реактивы: гексан (марки х. ч.); стандартный раствор дихромата калия; каротинсодержащее сырье.

Посуда и приборы: весы аналитические; фарфоровые ступки и пестики; воронки Бюхнера; спектрофотометр СФ-26 (кюветы с рабочей длиной 10 мм); мерные колбы вместимостью 100 мл.

Каротиноидные пигменты, присутствующие в растениях и водорослях, определяют их окраску от ярко-красного до желтого. Они не растворимы в воде, но растворяются в жирах и органических растворителях. Наибольшей биологической ценностью из них обладает красный пигмент – β -каротин. В последнее время, благодаря его радиопротекторным свойствам, он рассматривается как эффективное средство в профилактике различных видов канцерогенеза.

β -каротин является провитамином ретиналя (витамина А); попадая в организм животных, β -каротин подвергается ферментативному окислению с образованием двух молекул ретиналя



β -каротина больше всего содержится (мкг%) в моркови – 9, болгарском перце – 2, помидорах – 1, сливочном масле – 0,2...0,4.

Витамин А присутствует только в продуктах животного происхождения, особенно много его в печени морских животных и рыб, в рыбьем жире – 15 мкг%, печени трески – 4 м, сливочной масле – 0,5 мкг%, молоке – 0,025 мкг%.

Метод количественного определения β -каротина основан на его выделении путем экстракции с последующим колориметрированием на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Светопоглощение β -каротина обусловлено присутствием сопряженных π -связей, дающих максимум поглощения при 450...470 нм.

В качестве объекта исследования использовать каротинсодержащее сырье (морковь, томаты, болгарский перец), подвергнутое различной кулинарной обработке (бланшированное, отварное, жареное).

Методика проведения анализа

Подготовка исследуемого материала

Навеску исследуемого растительного материала (1...2 г) тщательно растереть в фарфоровой ступке с небольшим количеством измельченного стекла в 20...25 мл гексана, а надосадочную жидкость отфильтровывать на воронке Бюхнера. Осадок залить новой порцией гексана (10...15 мл) и повторить экстракцию несколько раз, пока экстракт, стекающий с фильтра, не станет бесцветным. Полученные фильтраты количественно перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести гексаном полученный объем до метки.

Определение массовой доли каротина

Раствор перемешать и колориметрировать на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с рабочей длиной 10 мм. Параллельно измерить оптическую плотность раствора стандартного образца – дихромата калия. В качестве раствора сравнения использовать экстрагент (соответственно гексан и дистиллированную воду).

Содержание каротиноидов в пересчете на β -каротин ($X_{\text{кар}}$, мкг%) вычислить по формуле

$$X_{\text{кар}} = \frac{D \cdot 0,0208 \cdot V \cdot 100}{D_0 \cdot m},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца;

0,0208 – количество β -каротина, соответствующее по окраске

1 мл стандартного раствора калия дихромата, мкг;

V – объем экстракта, мл;

m – масса навески, г;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Результаты обосновать и внести в таблицу 4.1.

Таблица 4.1 – Результаты эксперимента

Исследуемый образец	$\alpha, \text{г}$	D	$X_{\text{кар}}, \text{мкг}\%$

Контрольные вопросы

1. Дайте определение микроингредиентам, получившим название «витамины» и «витаминоподобные вещества».
2. Расскажите о принципах определения витаминов.
3. Способы определения витамина А и каротинов.
4. Методы определения аскорбиновой кислоты в пищевых системах.

Тестовые задания

1. Витамины являются соединениями:

- А) низкомолекулярными;
- Б) высокомолекулярными;
- В) среднемолекулярными;
- Г) низко-средне-высокомолекулярными.

2. Физиологическая роль витаминов:

- А) незаменимые факторы питания;
- Б) источник энергии;
- В) пластическим материалом;
- Г) источники эндогенной воды.

3. Авитаминоз – это состояние:

- А) глубокого дефицита витаминов;
- Б) переизбытка витаминов;
- В) умеренного дефицита;
- Г) норма.

4. Гиповитаминоз – это состояние дефицита витаминов:

- А) умеренного;
- Б) глубокого;
- В) отсутствие;
- Г) норма.

5. Гипервитаминоз – это состояние:

- А) избытка витаминов;
- Б) дефицита витаминов;
- В) глубокого дефицита;
- Г) норма.

6. Причины авитаминоза:

- А) низкое содержание витаминов в рационе;
- Б) высокое содержание витамина в рационе;
- В) нарушение ассимиляции витаминов;
- Г) нарушение диссимиляции витаминов.

7. Источники витаминов А, Д:

- А) печень рыб;
- Б) сливочное масло;
- В) морковь;
- Г) злаковые.

8. Водорастворимые витамины:

- А) группы В;
- Б) С;
- В) А;
- Г) Е.

9. Жирорастворимые витамины:

- А) группы В;
- Б) С;
- В) А;
- Г) Е.

10. Факторы, разрушающие витамины:

- А) температура;
- Б) свет;
- В) сроки уборки урожая;
- Г) присутствие минеральных веществ.

Тема 5.

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 десятыми, 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;
- 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. К наиболее дефицитным минеральным веществам в питании человека относятся элементы кальция и железо.

Для определения содержания минеральных веществ используют химические, физико-химические методы анализа – оптические и электрохимические. Классификация и краткая характеристика методов представлены на схеме (рис. 5.1).

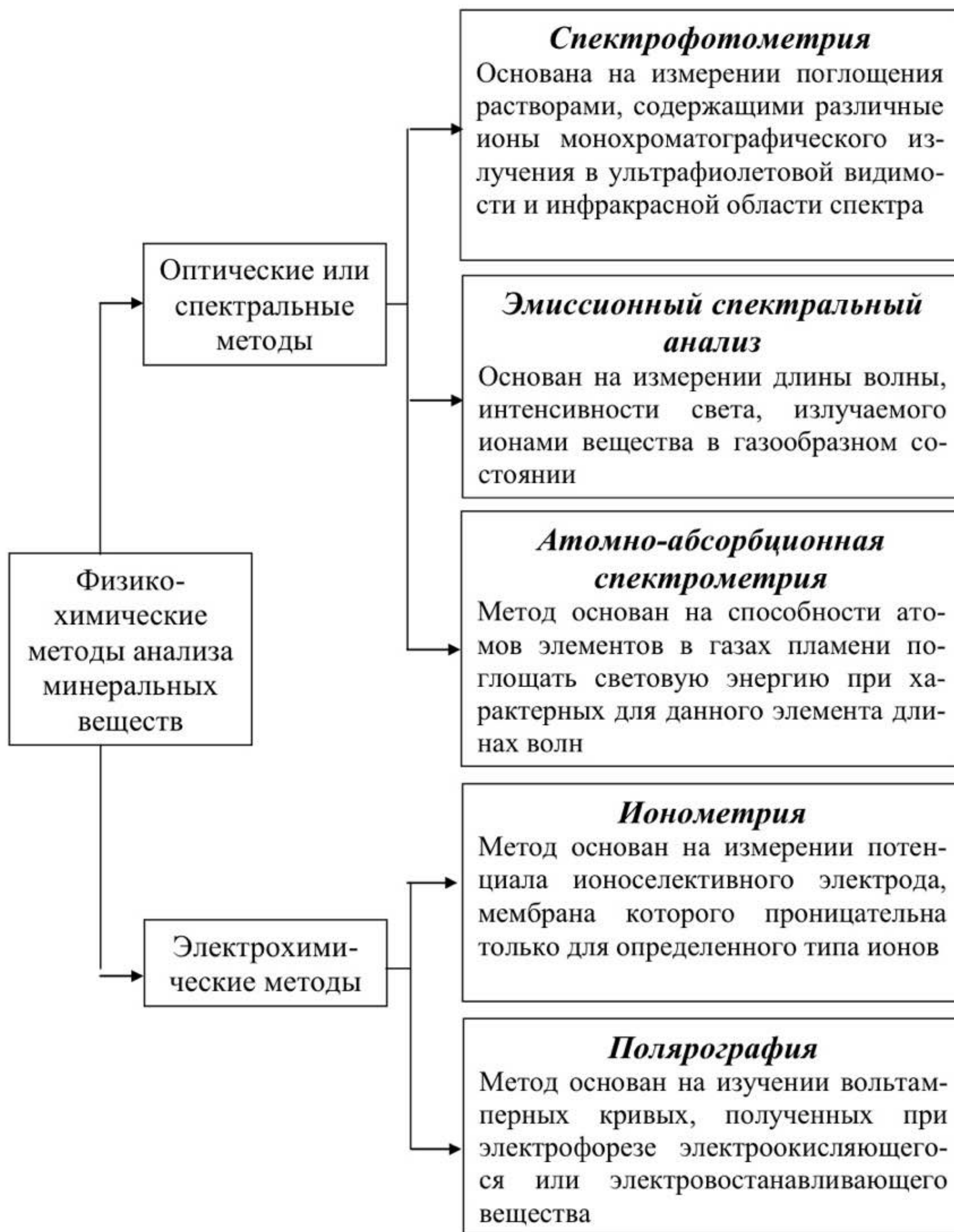


Рисунок 5.1 – Классификация методов анализа минеральных веществ

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.

5.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 5.1.1

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

Реактивы и материалы: щавелевокислый аммоний (насыщенный раствор: 5,8 г щавелевокислого аммония растворяют в 100 мл дистиллированной воды); серная кислота (1 часть концентрированной серной кислоты + 4 части воды); перманганат калия – 0,1 н. (готовится из фиксанала).

Методика проведения анализа

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

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

Промытый осадок растворяют на фильтре в 20 мл 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/л; a – количество 0,1 н. раствора перманганата калия, мл; 2,005 – количество кальция, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия, мг; 1000 – пересчет на 1 л; b – количество пробы, взятой для анализа, мл.

Контрольные вопросы

1. Классификация минеральных веществ.
2. Физико-химические методы анализа, используемые для анализа минеральных веществ
3. Сущность метода ионометрии. Перечислите индикаторные электроды, используемые в этом методе.
4. Сущность метода пламенной фотометрии. Какие ионы можно определять этим методом?
5. Метод градуировочного графика. В каких координатах он строится в методе пламенной фотометрии?
6. Сущность метода атомно-абсорбционной спектроскопии. Преимущества этого метода по сравнению с методом пламенной фотометрии.
7. Порядок подготовки проб пищевых продуктов для анализа методом атомно-абсорбционной спектроскопии.
8. Источник излучения в атомно-абсорбционном спектрофотометре.

Тестовые задания

1. Массовая доля макроэлементов не менее %:

- | | |
|----------------|----------------|
| А) 10^{-1} ; | В) 10^{-3} ; |
| Б) 10^{-2} ; | Г) 10^{-4} . |

2. Массовая доля микроэлементов, %:

- А) $10^{-2} \dots 10^{-5}$;
- Б) $10^{-6} \dots 10^{-7}$;
- В) $10^{-7} \dots 10^{-8}$;
- Г) $10^{-9} \dots 10^{-10}$.

3. В организме человека для кислотно-щелочного равновесия преобладают элементы:

- А) щелочные;
- Б) кислотные.

4. Роль минеральных веществ в организме человека:

- А) пластический материал;
- Б) энергетический материал;
- В) составляющая часть ферментов;
- Г) составляющая часть липидов.

5. Причинами нарушения обмена минеральных веществ являются:

- А) нарушение процесса всасывания в ЖКТ;
- Б) отсутствие ПНЖК;
- В) кулинарная обработка;
- Г) несбалансированное питание.

6. Обогащение продуктов питания проводят:

- А) белками;
- Б) липидами;
- В) витаминами;
- Г) минеральными веществами.

Тема 6.

ФЕРМЕНТЫ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Биохимические процессы, протекающие при хранении сырья и производстве пищевых продуктов, связаны с действием собственных ферментов сырья, а также ферментов, вносимых в ходе технологического процесса.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы, присутствующие в любой живой клетке, а следовательно, и в любом пищевом сырье растительного и животного происхождения. Спиртовое, молочнокислое брожение, использование солода и плесневелых грибов для осахаривания крахмалистого сырья, применение заквасок при приготовлении хлеба связаны с различными ферментативными процессами. Ферменты занимают центральное место в пищеварении и обмене веществ, так как без их участия пища не усваивается. Сущность действия ферментов заключается в том, что они расщепляют сложные химические структуры – белки, жиры, углеводы на более простые. Кроме того, ферментам свойственна и созидательная деятельность. Они осуществляют сборку сложных веществ из простых. Например, из отдельных фрагментов (аминокислот) синтезируются белки, из глицерина и жирных кислот – жиры данного организма.

Ферменты имеют различные молекулярные массы и могут быть построены из одной или нескольких полипептидных цепей и представлять собой сложные комплексы. Ферменты как биологические катализаторы имеют как общие свойства с химическими катализаторами, так и специфические, отличающие их от химических катализаторов. Специфичность ферментов заключается в том, что они все являются белками, эффективность их выше, чем у небиологических катализаторов, ферменты обладают избирательностью действия на субстраты. Все ферменты делятся на шесть классов в соответствии с типом катализируемых реакций: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы. Активность ферментов зависит от природы и концентрации субстрата, активной кислотности среды, температуры и других условий. Низкая температура снижает активность, повышение температуры от минимальной до оптимальной увеличивает активность фермента, высокая температура (обычно выше 60°C) ингибирует активность фермента.

Ферменты пищеварительной системы обладают некоторыми особенностями, так как они функционируют не в клетках, а в полости желудка и кишечника. Поэтому пищеварительные ферменты характеризуются низкой субстратной специфичностью.

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 к 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 pH и температуры. Все дальнейшие исследования проводят при насыщающей концентрации субстрата, оптимуме температуры и pH. 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, температура, 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 pH- 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, чтобы 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°C (лучше – в холодной комнате).
2. pH, 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, pH, 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, глюкозоизомераза, пектолитические, целлюлолитические и гемицелюлазные ферменты, молокосвертывающая кислая протеиназа, β -галактозидаза, липазы, липоксигеназы, β -фруктофуранозидаза, декстриназы и некоторые другие.

6.1. 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 регистрируются 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 происходят 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.

6.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 6.2.1

Определение активности алкогольдегидрогеназы

Акогольдегидрогеназа (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 pH 8,5; 3 М раствор этилового спирта; 0,0015 М раствор НАД, pH 6,0 (может несколько дней храниться на холоде); алкогольдегидрогеназа – 1 Е/мл свежеприготовленный раствор на 0,1%-м растворе бычьего сывороточного альбумина в 0,01 М калий фосфатном буфере pH 7,5.

Методика проведения анализа

В спектрометрическую кювету помещают реакционную смесь, содержащую 2,2 мл H_2O , 0,5 мл буфера pH 8,5, 0,1 мл этанола и 0,1 мл НАД. Реакцию начинают добавлением 0,1 мл раствора алькогольшедегидрогеназы. Содержимое кюветы быстро перемешивают и измеряют увеличение оптической плотности в течение 45 с. 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 $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. 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 мл 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 мл.

Лабораторная работа 6.2.2

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: 96%-й этиловый спирт; смесь жирных кислот: 50 г рафинированного подсолнечного масла растворяют при нагревании в 50 мл 96%-го этилового спирта. Отдельно растворяют при нагревании 15 г едкого калия в 10 мл воды и затем добавляют 50 мл 96%-го этилового спирта. Оба раствора нагревают до кипения и смешивают.

вают (щелочной раствор вливают в масло). Затем спирт отгоняют и в колбу приливают избыток 10%-го раствора HCl. Смесь перемешивают и нагревают до полного разложения мыла. Жирные кислоты отделяют на делительной воронке и промывают несколько раз горячей водой до полного удаления остатков минеральной кислоты.

Гомогенные субстраты: 0,5 мл Твин-40 вносят в 10 мл боратного буфера pH 9,0. Затем по каплям добавляют 0,5 мл смеси жирных кислот, интенсивно перемешивают и добавляют 1,3 мл раствора 1 н. NaOH. Раствор доводят до 100 мл 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 (pH 9,0). При определении активности липоксигеназы в пшенице субстрат разбавляют 2,5 части воды и подкисляют до 7,0.

Методика проведения анализа

В коническую колбу вносят 10 мл субстрата и 1 мл фермента. Смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем из инкубационной смеси отбирают 0,5 мл и переносят в пробирку, содержащую 4,5 мл 96%-го 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 мл воды.

Активность липоксигеназы выражается как изменение оптической плотности, вызываемое 1 мг ферментного белка за 1 ч при данных условиях:

$$\text{Активность липогеназы} = \frac{(A_{\text{опыт}} - A_{\text{контроль}}) \cdot 60}{20 (\text{мг белка в ферментативном препарате})}$$

Контрольные вопросы

1. Назовите основные этапы выделения и очистки ферментов.
2. Перечислите принципиально важные условия, необходимые 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. Сущность метода колориметрического определения амилазной активности

6. Какую реакцию катализирует фермент липоксигеназа, на чем основано определение его активности?
7. Сущность метода определения активности каталазы и пероксидазы. Какие реакции катализируют эти ферменты?
8. 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. Перечислите функции глутатиона в клетке, сущность метода его определения.

Тестовые задания

1. Участвуют в деполимеризации ферменты:

- | | |
|-------------|--------------|
| А) липазы; | Б) протеазы; |
| В) амилазы; | Г) лакказа. |

2. Ферменты, участвующие в переваривании белков:

- | | |
|-------------|--------------------|
| А) трипсин; | Б) химотрипсин; |
| В) амилазы; | Г) аминопептидазы. |

3. Ферменты, участвующие в переваривании углеводов:

- | | |
|------------------|-----------------------|
| А) амилазы; | Б) карбоксипептидазы; |
| В) дисахаридазы; | Г) аминопептидазы. |

4. Ферменты, участвующие в переваривании жиров:

- | | |
|------------------|-----------------------|
| А) амилазы; | Б) липазы; |
| В) дисахаридазы; | Г) карбоксипептидазы. |

Тема 7.

ВОДА

Вода – самое важное вещество для всего живого на Земле. Сам человек более чем на 2/3 состоит из воды, причем в наиболее интенсивно работающих органах ее содержание выше, например, в крови содержание воды 83%, в мозге 75%, мышцах 75%, коже 72%, в скелете 22%. В среднем в организме животных содержится порядка 70% воды. Считается, что человек не может прожить без воды более 2...3 суток, а без пищи он может прожить несколько недель.

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 – это вещество, которое непосредственно воздействует на формирование и стабилизацию нативной структуры макромолекул биополимеров, биомембран и различных более сложных надмолекулярных образований, что приводит к изменению конформации биополимеров и обеспечивает, с одной стороны, их стабильность, а с другой – модификацию их свойств.

Вода – важная составляющая пищевых продуктов, без которой жизнь невозможна. 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°C.

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°C.

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

$$a_w = \frac{P_w}{P_o},$$

где a_w – «активность воды»; P_w – давление паров воды над данным продуктом; P_o – давление паров над чистой водой.

Учитывая важность воды для всех биологических систем, в том числе и человека и тот факт, что вода является обязательным компонентом пищевых продуктов и обуславливает многие их свойства, в том числе и сроки их хранения, рассмотрение свойств воды является важным разделом пищевой химии.

7.1. Свойства воды

Описание свойств воды начинают обычно с характеристики аномалий, присущих воде. Необычные свойства воды особенно ярко выделяются на фоне свойств ее гомологов: H_2S , H_2Se , H_2Te . Молекула воды является самым первым и легким представителем этого гомологического ряда, однако гидриды серы, селена и теллура при комнатной температуре находятся в газообразном состоянии.

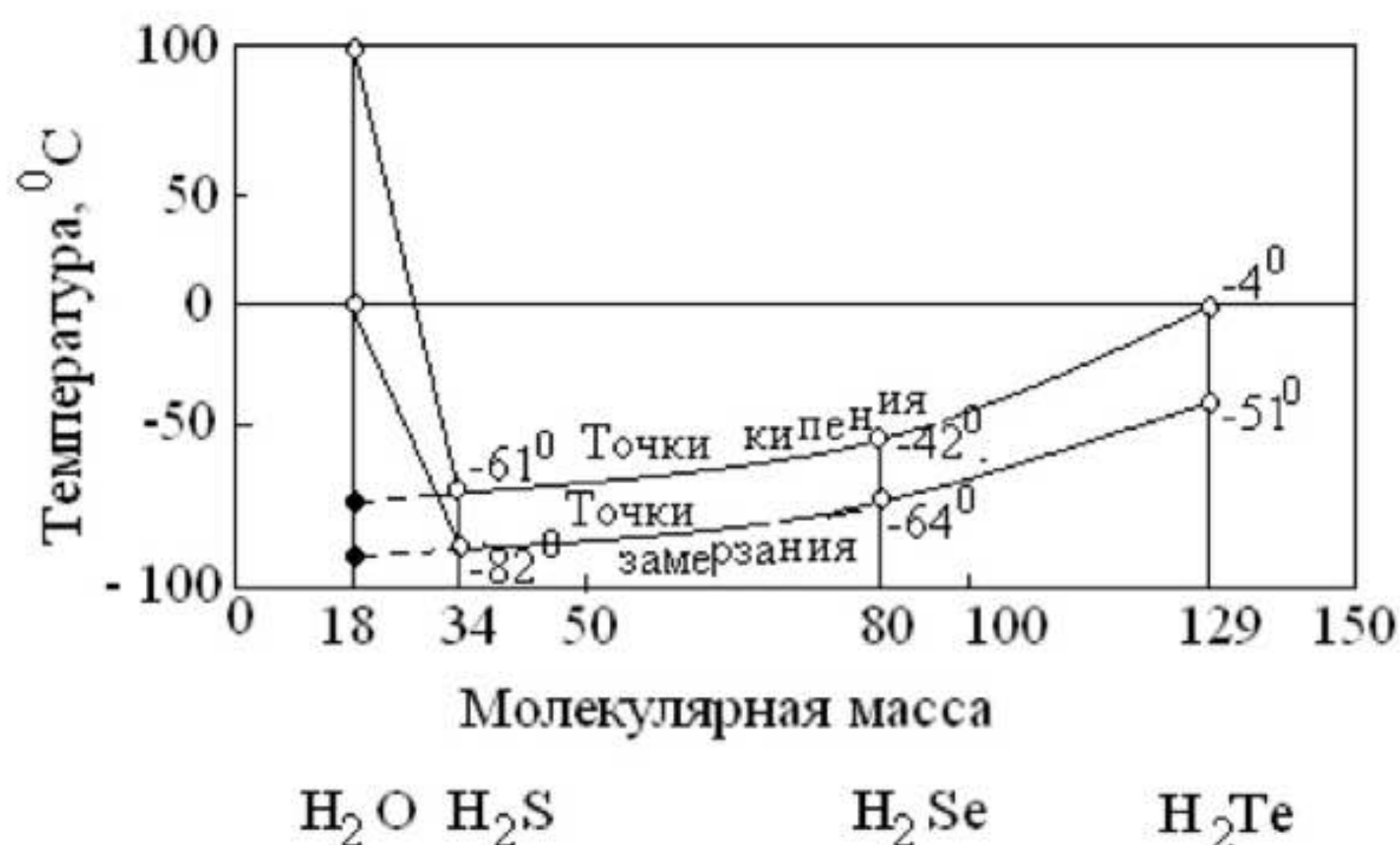


Рисунок 7.1 – Точки плавления и кипения гидридов VI группы периодической системы элементов

И вода, если бы она была обычным членом гомологического ряда, должна бы в соответствии со своей молекулярной массой закипать при -70°C и превращаться в лед при -90°C , а значит, не могла бы быть основой жизни на Земле.

Другая особенность воды – это аномальное изменение плотности в зависимости от температуры (рис. 7.2).

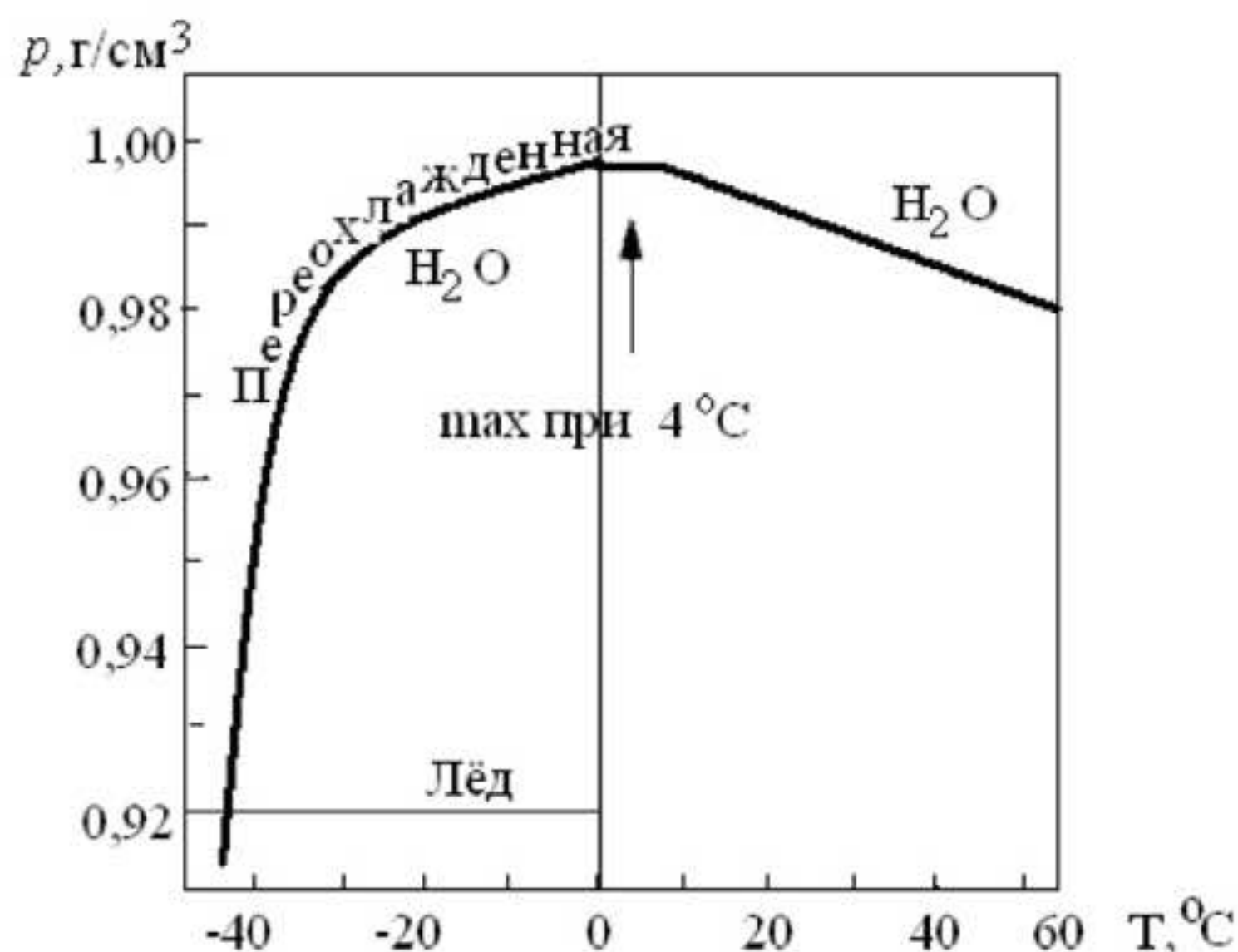


Рисунок 7.2 – Зависимость плотности воды от температуры

В обычных жидкостях плотность всегда уменьшается с ростом температуры. Для воды характер изменения плотности в зависимости от температуры другой – после таяния льда она увеличивается, проходит через максимум при 4°C и затем уменьшается с ростом температуры.

Жидкая вода имеет максимум плотности не в точке плавления, а при 4°C , и ее плотность уменьшается как при повышении температуры, так и при ее понижении до температуры возможного переохлаждения, равной при 1 атм -40°C . При этом плотность воды больше плотности льда на 10%, благодаря чему лед плавает на поверхности воды. При 4°C вода уменьшается в объеме до минимальных значений, а при дальнейшем понижении температуры от 4 до 0°C расширяется (рис. 7.3).

Минимум объема воды при 4°C обусловлен, по мнению Г.Н. Зацепиной, особенностью межмолекулярного взаимодействия системы H_2O , в которой число межмолекулярных переходов протонов равно числу внутримолекулярных переходов. Вода, превращаясь в лед, благодаря увеличению объема приобретает огромную силу, способность

разрушать крепчайшие породы и вместе с тем это спасает нашу планету от оледенения, так как максимум плотности при 4°C предотвращает конвективное перемешивание жидкости и опускание на дно поверхностных слоев воды, остывших до температуры ниже 4°C , что замедляет дальнейшее охлаждение и промерзание водоемов.

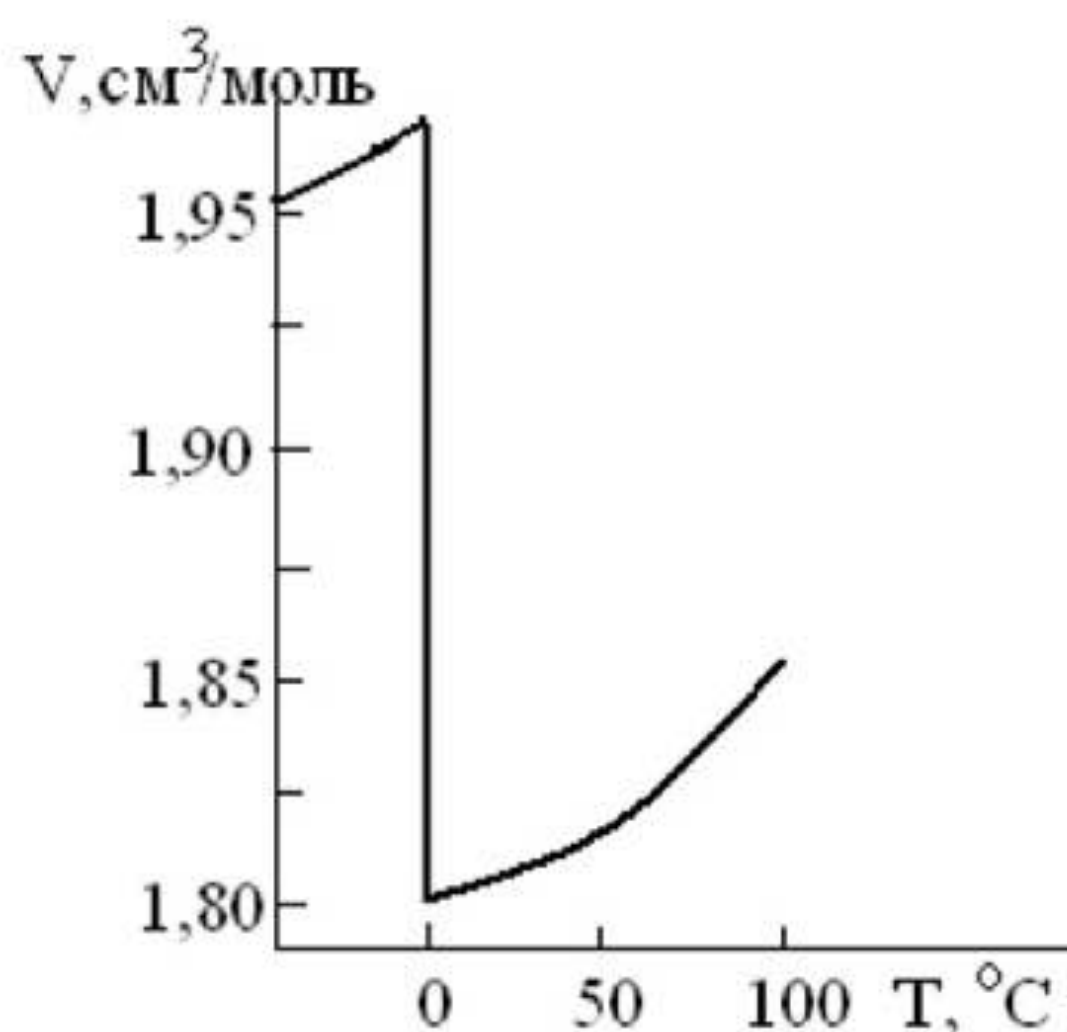


Рисунок 7.3 – Зависимость молекулярного объема воды и льда от температуры

Морская вода, в отличие от пресной, ведет себя иначе. Наличие различных солей меняет ее физико-химические свойства. Она замерзает при $-1,9^{\circ}\text{C}$ (переохлажденная вода) и имеет максимальную плотность при $-3,5^{\circ}\text{C}$, то есть она превращается в лед, не достигая наибольшей плотности. Переохлажденная вода, то есть остающаяся в жидком состоянии ниже точки замерзания 0°C , ведет себя странно: с одной стороны, плотность воды сильно уменьшается по мере переохлаждения, но, с другой стороны, она приближается к плотности льда при понижении температуры.

Другая аномалия воды – необычное поведение ее сжимаемости, то есть уменьшение объема при увеличении давления. Для обычных жидкостей сжимаемость растет с температурой – при высоких температурах жидкости более рыхлы, имеют меньшую плотность, их легче сжать. Вода так ведет себя при высоких температурах – выше 50°C . При низких температурах, от 0 до 45°C , сжимаемость воды меняется противоположным образом, в результате при 45°C появляется минимум. Изотермическая сжимаемость воды при температуре 0°C в четыре раза больше, чем изотермическая сжимаемость льда (рис. 7.4).

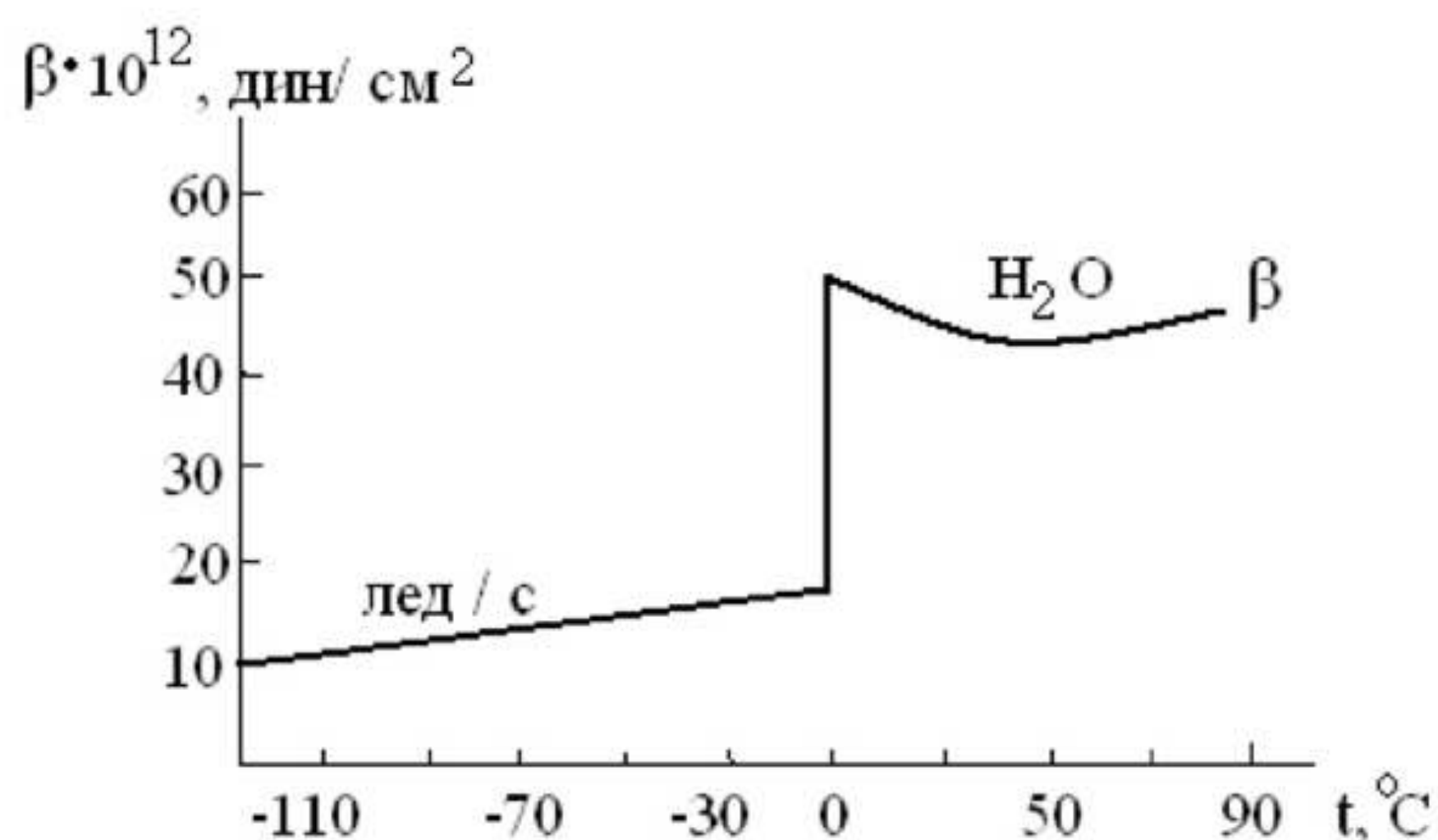


Рисунок 7.4 – Зависимость сжимаемости воды от температуры

Максимальное изменение сжимаемость испытывает при плавлении. Сжимаемость воды и льда мала по сравнению со сжимаемостью других веществ (табл. 7.1).

Таблица 7.1 – Сжимаемость ряда веществ в интервале температур от 5 до 30 °С

Т, °С	$\beta_g \cdot 10^{12}$, дин/мл		
	Вода	Метанол	Бензин
5	51,6	-	84,2
10	48,7	114,9	88,5
15	-	118,8	92,2
25	46,6	122,7	95,6
30	45,8	131,0	103,1

Указанные особенности изменения сжимаемости воды и льда объясняют характером водородных связей в них.

На этих примерах видно, что необычные свойства воды характеризуются появлением максимумов или минимумов на кривых зависимостей от температуры. Такие зависимости означают, что имеют место два противоположных процесса, которые и определяют данные свойства. Один процесс – это обычное тепловое движение, которое усиливается с ростом температуры и делает воду, как и любую другую жидкость, более разупорядоченной. Другой процесс необычный, присущий только воде, за счет его вода становится более упорядо-

ченной при низких температурах. Разные свойства воды по-разному чувствительны к этим двум процессам, и поэтому положение экстремума наблюдается для каждого свойства при своей температуре.

Самая сильная аномалия воды – это температурная зависимость ее теплоемкости. Величина теплоемкости показывает, сколько нужно затратить тепла, чтобы поднять температуру вещества на один градус. При нагревании вещества теплоемкость, как правило, возрастает для всех веществ, кроме воды. Изменение теплоемкости воды с повышением температуры аномально – от 0°C до 37°C она падает и от 37°C до 100°C начинает повышаться. Теплоемкость водяного пара приближается к теплоемкости льда. Минимальное значение теплоемкости воды имеет около 37°C Это нормальная температура тела человека (36,6...37°C), именно при этой температуре происходят сложные биохимические процессы в организме человека, значит, энергетически это наиболее выгодные условия. Для подавляющего числа веществ теплоемкость жидкости после плавления кристалла изменяется незначительно (табл. 7.2).

Таблица 7.2 – Теплоемкость вещества в трех агрегатных состояниях

Агрегатное состояние	Теплоемкость вещества (C_p^0 , кал/моль)						
	H ₂ O	NH ₃	CH ₄	HCl	H ₂	Hg	Na
Газообразное	8,7	9,9	-	6,7	6,9	-	5,0
Жидкое	18,0	12,0	11,0	12,0	11,0	6,8	7,6
Твердое	9,0	9,0	14,0	15,0	13,0	6,7	8,0

Вода же при плавлении льда меняет теплоемкость в два раза, такого огромного скачка при плавлении не наблюдается ни у одного вещества. Теплоемкость льда имеет очень низкое значение, она близка к теплоемкости одноатомных кристаллов и равна теплоемкости твердого аммиака. В процессе плавления металлов теплоемкость практически не изменяется, для веществ из многоатомных молекул в процессе плавления она, как правило, уменьшается, что, вероятно, связано с тем, что молекулы могут свободно вращаться в жидкости и не могут в твердом теле. Для таких соединений, как H₂O и NH₃, теплоемкость в жидком состоянии много больше, чем в твердом. Это означает, что в воде открываются какие-то новые энергоемкие процес-

сы, на которые тратится подводимое тепло, что и обуславливает появление избыточной теплоемкости, причем это характерно для всего диапазона температур, при которых вода находится в жидком состоянии. Эта аномалия исчезает только в паре, то есть это свойство присуще именно жидкой воде. Для переохлажденной воды теплоемкость еще больше возрастает при сильном переохлаждении, то есть переохлажденная вода еще более аномальна, чем обычная. Высокая теплоемкость воды и высокая удельная теплота плавления среди простых веществ (лед трудно растопить, а воду заморозить) способствуют смягчению климата на Земле, не происходит резкого перепада температур зимой и летом, ночью и днем, поскольку существует гигантский регулятор, своеобразный термостат – воды Мирового океана.

Другой величиной, которая определяет характер теплового движения в жидкостях, является теплопроводность. Зависимость изменения теплопроводности воды от температуры приведена на рисунке 7.5.

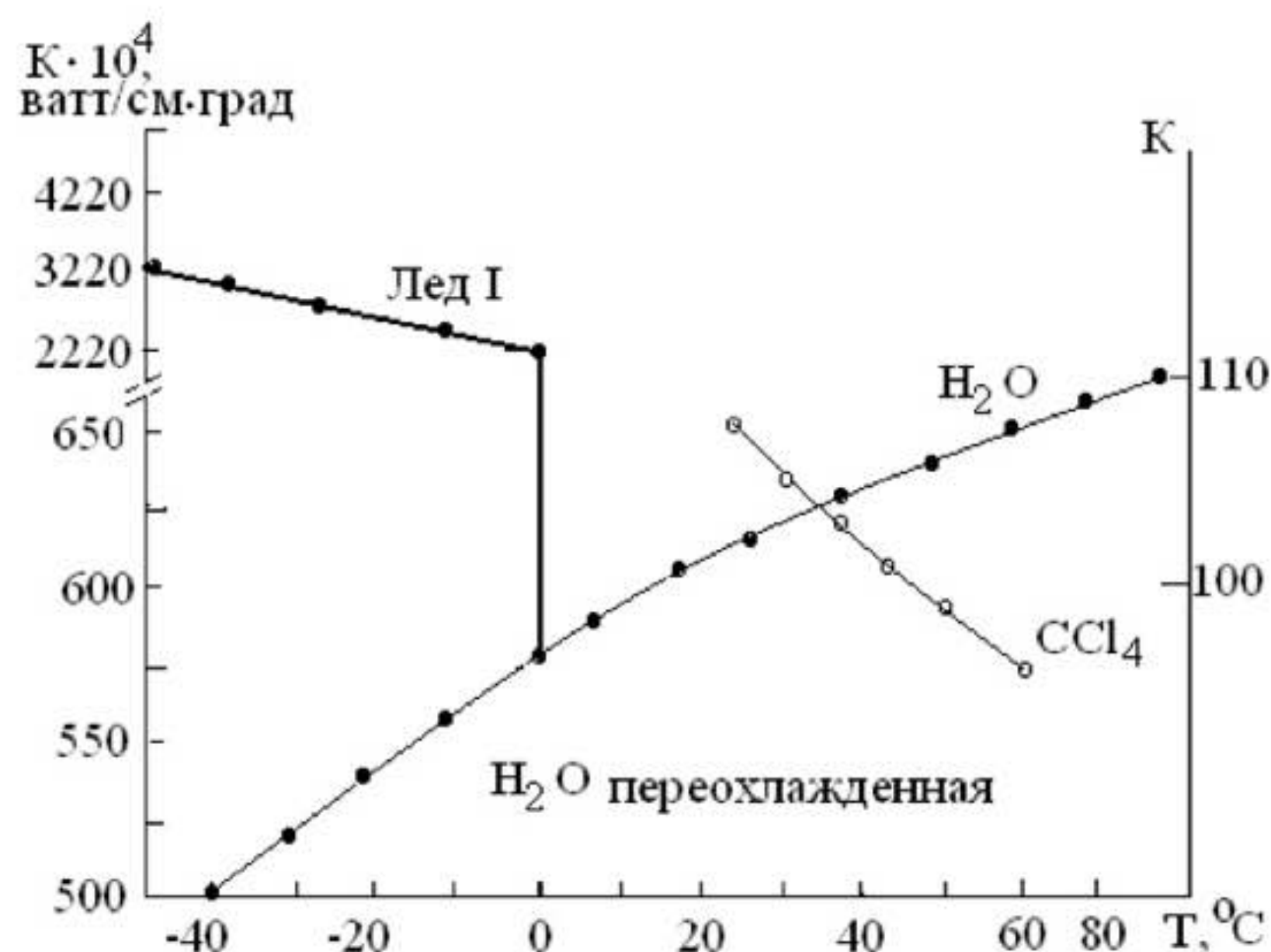


Рисунок 7.5 – Зависимость теплопроводности воды и CCl_4 от температуры

Для сравнения приведено изменение теплопроводности CCl_4 , который ведет себя как обычная жидкость, то есть с ростом температуры уменьшается теплопроводность и растет теплоемкость. Как видно из рисунка 7.5, теплопроводность при плавлении льда уменьшается приблизительно в 4 раза. Переохлажденная вода имеет тот же характер изменения теплопроводности, что и обычная.

Все нормальные жидкости с ростом давления изменяют знак зависимости теплопроводности от температуры. Теплопроводность воды не изменяет характера температурной зависимости под давлением. Относительная величина увеличения теплопроводности воды при давлении 1200 кг/мл составляет около 50%, в то время как для нормальных жидкостей это увеличение при том же давлении составляет приблизительно 270%. Теплопроводность воды слабо зависит от давления, что связано с малой сжимаемостью воды по сравнению с другими жидкостями.

И, наконец, еще одно удивительное свойство воды, связанное с особенностями ее поверхностного натяжения. Вода в свободном состоянии принимает шарообразную форму (капли дождя, росы). На границе двух сред (вода – воздух) силы межмолекулярного притяжения действуют с одной стороны, стягивая поверхность жидкости. На структуру поверхностного слоя воды влияет два фактора – полярность молекул воды и сетка водородных связей. Поверхностное натяжение воды 72 мН/м (миллиньютон/метр). Это поверхностное натяжение настолько велико, что смоченные водой две пластинки из стекла удастся разъединить только с помощью огромных усилий. Из всех известных жидкостей силы поверхностного натяжения воды по своей величине уступают только ртути (-500 мН/м).

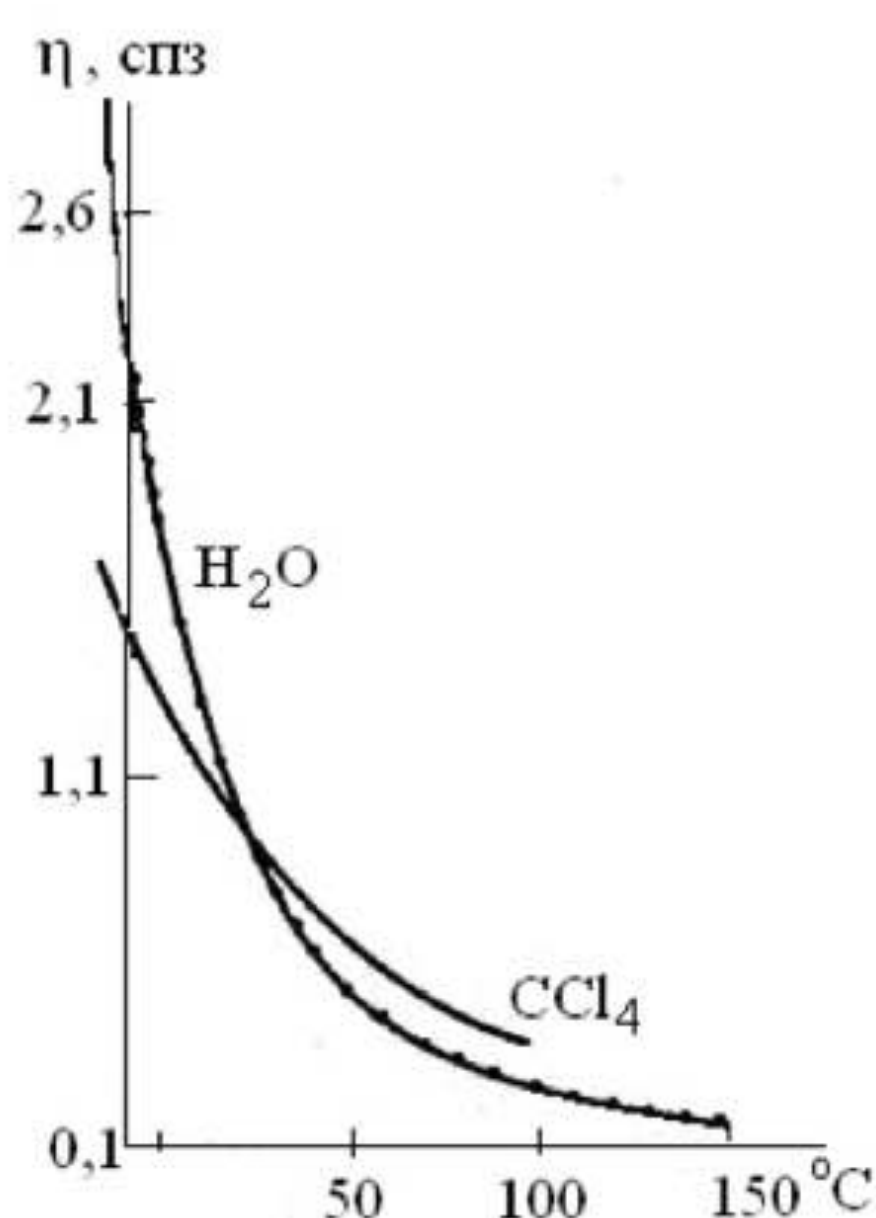


Рисунок 7.6 – Зависимость сдвиговой вязкости от температуры для H_2O и CCl_4

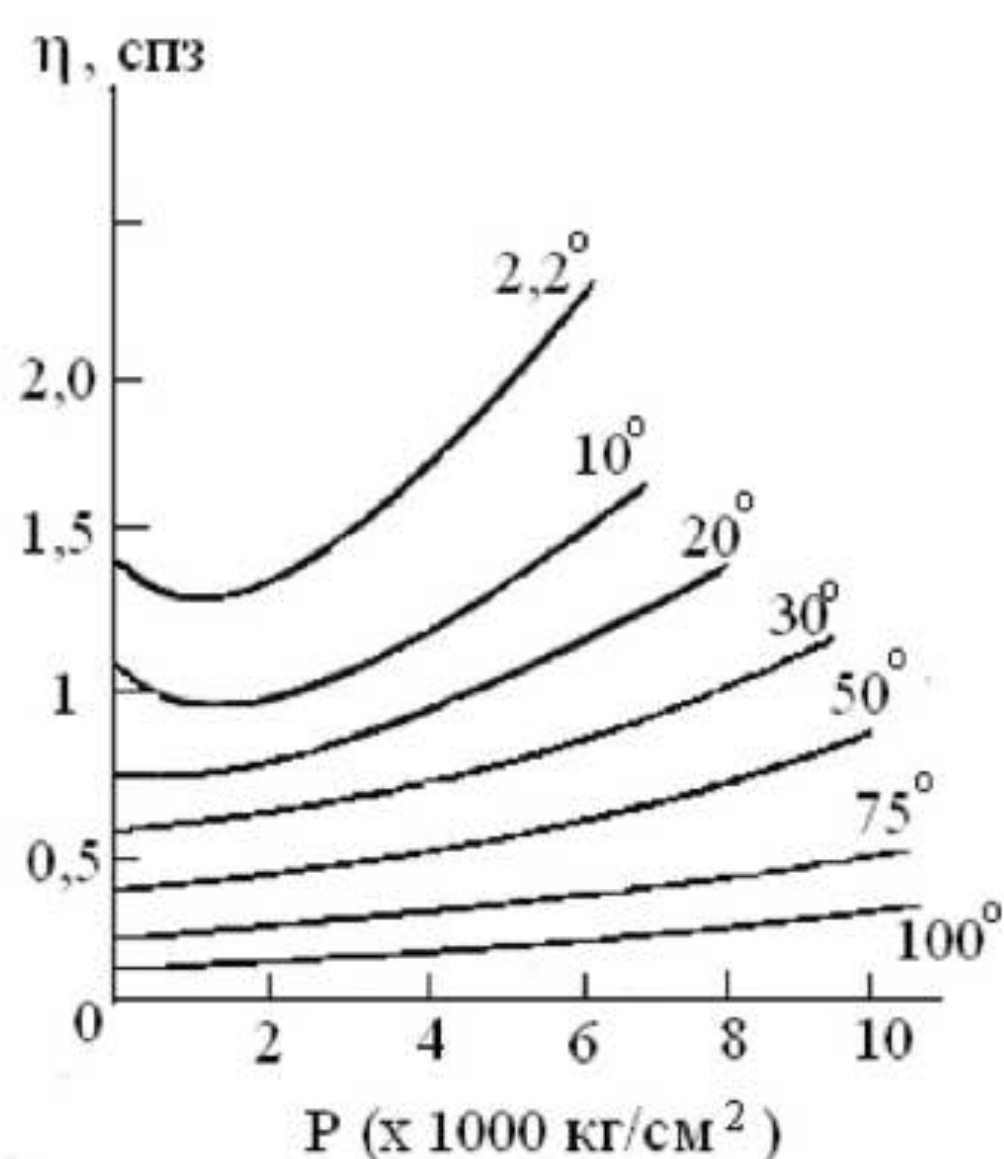


Рисунок 7.7 – Зависимость сдвиговой вязкости от давления для ряда температур

Еще одно аномальное свойство воды – ее вязкость. Обычные жидкости с повышением давления увеличивают вязкость, а с ростом температуры уменьшают. Характер изменения вязкости у воды другой. На рисунке 7.6 представлена зависимость вязкости от температуры для H_2O и CCl_4 .

Как видно из рисунка, вязкость CCl_4 до температуры около 23°C меньше, чем у воды, а для больших температур она больше, чем у воды. Зависимость вязкости от давления для разных температур приведена на рисунке 7.7. Очевидно, что для низких температур с ростом давления вплоть до 2000 атм. вязкость воды уменьшается, а затем начинает расти, и при температуре 100°C кривая близка по характеру зависимости к кривым для обычных жидкостей.

Увеличение вязкости для них с ростом давления связано с уменьшением длины свободного пробега молекул, так как при большем давлении они плотнее упакованы.

Как видно из приведенных характеристик, вода действительно является необычной, аномальной жидкостью, и природа этих аномалий кроется в особенностях ее структуры.

7.2. Кластерная структура воды

Поскольку вода является сложной ассоциированной жидкостью с динамическим характером связей, описание ее свойств на молекулярном уровне возможно лишь с помощью квантово-механических моделей различной сложности и строгости. Таких моделей достаточно много. В последние годы все больше появляется данных о существовании сетки водородных связей в воде в виде разнообразных структур кластерного типа.

Под *кластерами* понимают кристаллоподобные структуры, которые могут содержать полости. Водные кластеры структурно могут быть подобны кластерам углерода и кремния (фуллерены, алмаз, графит, силикаты). Такое подобие определяется способностью атомов углерода и кремния образовывать по четыре ковалентные связи, а у атома кислорода воды также четыре связи (две ковалентные и две водородные). Следует заметить, что углерод – основа всего живого, кремний – основа неживой материи и вода, объединяющая эти два мира, способна образовывать связи тетраэдрической конфигурации.

Имеются квантово-химические расчеты, подтверждающие возможность существования устойчивых водных кластеров, которые, блокируясь друг с другом, могут достичь громадных размеров, включающих в себя 280 и более молекул воды, фактически это полимерные молекулы, построенные из тетраэдрической сетки.

Свойство тетраэдрических сеток водородных связей воды образовывать различные структурные конфигурации проявляется в существовании соединений включения (клатратные гидраты). Это *система «гость – хозяин»*. Простейшая модель – додекаэдр, образованный молекулами воды («хозяин»), в полость которого помещаются небольшие молекулы, например, метан («гость»).

Структура воды позволяет объяснить ее многочисленные аномальные свойства. Резкое увеличение плотности при плавлении льда связано с тем, что сетка водородных связей льда сильно искажается после плавления, углы между связями отклоняются от оптимальных, тетраэдрических, в результате чего уменьшается объем пустого пространства между молекулами воды. Уменьшение плотности при понижении температуры ниже 4°С определяется перестройкой структуры водной сетки: чем ниже температура, тем ажурнее становится сетка, больше объем пустого пространства. При высоких температурах перестройка структуры сетки мало влияет на плотность, поскольку сетка в этом случае сильно отличается от ажурной, тетраэдрической. Тогда преобладает общее для всех веществ свойство – увеличение расстояния между частицами при нагревании. Аналогично объясняются и другие аномалии воды при низких температурах. Общая причина аномального поведения воды при низких температурах заключается в том, что при этом сетка водородных связей воды не очень искажена по сравнению с тетраэдрической конфигурацией и при изменении температуры первостепенное значение имеет перестройка структуры этой сетки, которая и определяет аномальный вклад в поведение наблюдаемого свойства воды. При высоких температурах, когда водная сетка сильно деформирована, ее перестройка оказывает меньшее влияние и вода ведет себя как все обычные жидкости.

Деформация сетки при изменении температуры требует затрат энергии, что и объясняет аномальный вклад в теплоемкость.

Особые свойства сетки водородных связей определяют аномальное поведение не только чистой воды, но и многих ее растворов.

7.3. Водные растворы

Процессы растворения веществ достаточно сложны и неоднозначно трактуются. Ясно, что при этом происходят структурные изменения как с растворяемым веществом, так и водой. Наиболее существенные изменения происходят при растворении.

Появление ионов приводит к двум взаимно противоположным изменениям структуры воды. С одной стороны, влияние поля иона нарушает упорядоченность молекул воды, с другой – действие поля иона ориентирует молекулы воды и приводит к новому упорядоченному размещению их вокруг иона, причем с наибольшей силой ионы действуют на близлежащий слой воды, который достаточно прочно связывается с ионами. Получила распространение модель гидратации ионов, которая предусматривает двухслойную гидратную оболочку иона. Вокруг каждой частицы имеется три концентрические зоны. Во внутренней зоне создается довольно прочная оболочка вокруг иона. Во внешней зоне структура воды полностью сохраняется, а влияние иона приводит к некоторой дополнительной поляризации, что сопровождается увеличением дипольного момента молекул воды. Промежуточная зона испытывает влияние двух противоположных сил – ориентацию иона, ослабленную экранированием внутренней зоны, и влияние внешней зоны нормальной воды, стремящейся сохранить свою структуру.

Белки, имеющие в своем составе как гидрофильные группы, которые стремятся к максимальному контакту с водным окружением, так и гидрофобные группы, которые стремятся к минимальному контакту с водой, образуют в воде глобулу с гидрофобным ядром и гидрофильной поверхностью. Подобно гидратации ионов, структура воды при взаимодействии с белками имеет: первый гидратизационный слой; второй гидратизационный слой с меньшей разупорядоченностью структуры воды и третий, имеющий структуру обычной воды.

Небольшое количество воды присутствует и внутри глобулы белка. Так, после 48 часов сушки в вакууме (10^{-5} мм рт. ст.) белки сохраняют около 1% воды по отношению к их массе. Более полное извлечение воды приводит к деструкции макромолекулы белка. Наличие некоторого минимального количества воды в макромолекулах белка является необходимым условием для выполнения ими своих биологических функций.

Вода в биологических мембранах рассматривается как организующий фактор, с помощью которого формируется пространственная бислойная структура мембран, т.е. вода является стабилизатором их нативной структуры.

7.4. Методы определения влаги

Содержание влаги можно определить следующими методами:

I. Определение общей влаги:

- 1) метод высушивания до постоянной температуры;
- 2) метод титрования по модифицированному методу Карла Фишера;
- 3) определение влажности пищевых продуктов с применением ИК-сушки.

II. Определение свободной и связанной влаги:

- 1) метод дифференциальной сканирующей калориметрии;
- 2) термогравиметрический метод;
- 3) на основе диэлектрических измерений;
- 4) на основе измерения теплоемкости;
- 5) метод ядерно-магнитного резонанса (ЯМР);

III. Определение активности воды на автоматическом приборе «Аквалаб»

7.5. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 7.5.1

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

$$\text{РОВ} = 100 \cdot a_w .$$

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, полученных с помощью весового метода.

Исходное содержание влаги в образце пищевого продукта определяют стандартным методом высушивания до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 105°C.

В качестве стандартных используют насыщенные растворы некоторых солей, значения РОВ и растворимость в воде которых при температуре 25°C представлены в таблице 7.4.

Таблица 7.4 – Значения РОВ и растворимость в воде некоторых солей 25°C

Соль	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 таблицы 7.4, 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. 7.4), и добавляют необходимое количество дистиллированной воды. Полученную смесь нагревают при перемешивании до 100°C 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.

Определение активности воды в образцах кондитерских изделий методом определения РОВ

Методика проведения анализа

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 л.

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 (%)

$$PB = 100 \cdot \frac{m_1 - m_0}{m_2},$$

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.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятиям свободная и связанная влага.
2. Влияние влажности пищевого продукта на его сохранность.
3. Методы определения влаги.
4. «Активность воды», методы ее определения.
5. Аномальные свойства воды.
6. Какое строение имеет молекула воды?
7. Структура льда.
8. Что подразумевается под системой «гость – хозяин»?

Тестовые задания

1. Функции воды:

- А) растворитель;
Б) стабилизатор температуры тела;
В) неосновная часть пищевого продукта;
Г) переносчик нутриентов и пищевых отходов.

**2. Норма потребления воды для человека на 1 кг массы тела
мл в сутки:**

- A) 20; B) 25...40;
B) 50...70; Г) 10...20.

3. Критерии связанной воды:

- А) замерзает при низких температурах;
Б) служит растворителем;
В) характеризует равновесное влагосодержание;
Г) существует вблизи растворенного вещества.

4. Свободная вода с полимерами:

- А) связана всегда;
Б) не связана;

- В) связаны при высоких температурах;
- Г) связана при низких температурах.

5. Продукты с высоким содержанием воды:

- А) фрукты;
- Б) ягоды;
- В) шоколад;
- Г) печенье.

6. Продукты с низким содержанием воды:

- А) сахар;
- Б) мед;
- В) шоколад;
- Г) сыр.

7. Продукты с промежуточной влажностью:

- А) карамель;
- Б) мука;
- В) яйцо;
- Г) мед.

8. Изотерма сорбции позволяет оценить:

- А) вкус продукта;
- Б) стабильность продукта;
- В) сложность удаления влаги;
- Г) наличие влаги.

9. Способы регулирования активности воды:

- А) вымачивание;
- Б) адсорбция;
- В) сушка на солнце;
- Г) сушка посредством осмоса.

Тема 8

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.

Органические кислоты в растениях находятся главным образом в виде солей, эфиров, димеров, а также в свободном виде, образуя буферные системы в клеточном соке растений. В различных органах растений органические кислоты распределены неравномерно: в плодах и ягодах преобладают свободные кислоты, в листьях — в основном связанные.

Значительное влияние на накопление органических кислот оказывают местопроизрастание растений, используемые удобрения, поливы, фаза развития растений, степень зрелости плодов, сроки хранения, температура. В незрелых плодах и стареющих листьях накапливаются яблочная, лимонная и винная кислоты. В старых листьях листовых овощей (щавель, шпинат, ревень) преобладает щавелевая кислота, а в молодых — яблочная и лимонная.

Уксусная кислота является наиболее известной пищевой кислотой и выпускается в виде 70...80% собственно кислоты. В быту используют разбавленную в воде эссенцию, получившую название уксус. Уксусную кислоту получают путем уксусного брожения. Основная область использования — овощные консервы и маринованные продукты.

Молочная кислота выпускается концентрацией 40%. Концентрат, содержащий не менее 70% кислоты, получают молочнокислым брожением. Используется в производстве безалкогольных карамельных масс, кисломолочных продуктов. Молочная кислота имеет ограничения по применению в продуктах детского питания.

Лимонная кислота является продуктом лимоннокислого брожения сахаров. Имеет наиболее мягкое действие по сравнению с другими пи-

щевыми кислотами. Используется при приготовлении безалкогольных напитков и некоторых видов рыбных консервов.

Яблочная кислота имеет менее кислый вкус по сравнению с лимонной и винной кислотами. Для промышленного использования эту кислоту получают синтетическим путем из малеиновой кислоты. Используют в кондитерском производстве и получении безалкогольных напитков.

Винная кислота является продуктом переработки отходов виноделия. Не обладает каким-либо существенным раздражающим действием на слизистую желудочно-кишечного тракта и не подвергается обменным превращениям в организме человека. Основная часть ее (80%) разрушается в кишечнике под действием бактерий. Применяется в производстве кондитерских изделий и безалкогольных напитков.

Янтарная кислота представляет собой побочный продукт производства адипинов. Используется в пищевой промышленности для регулирования рН пищевых систем.

Неорганические кислоты, такие, как фосфорная, серная и соляная, присутствуют в томатах, что является отличительной особенностью этого вида плодов.

Фосфорная кислота и ее соли – фосфаты калия, кальция, натрия – широко распространены в пищевом сырье и продуктах его переработки. Используют при производстве кондитерских изделий и безалкогольных напитков.

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).

Органические кислоты и их соли хорошо растворимы в воде, спирте или эфире. Многие органические кислоты являются фармакологически активными веществами (лимонная, никотиновая, аскорбиновая). Лимонная, винная и яблочная широко используются в пищевой промышленности для изготовления фруктовых напитков и кондитерских изделий. Винная кислота применяется при производстве разрыхлителей теста.

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. Большинство органических кислот можно определить хроматографическими методами. К альтернативным относятся методы ферментативного анализа, отличительной особенностью которого являются специфичность, обеспечивающая достоверность результатов, высокие чувствительность и точность.

8.1. 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. 8.1); этерифицирующая смесь: свежеприготовленный 7%-й раствор хлористого водорода в этаноле (смешивают 4 объемные части спирта с 1 объемной частью концентрированной соляной кислоты); адипиновая кислота (стандарт); диэтиленгликоль-сукцинат; сорбент – Хромосорб-W, 60...80 меш; четыреххлористый углерод (или хлороформ); гексан; 80%-й водный раствор этанола; этанол; о-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. 8.1).

Таблица 8.1 – Характеристика объектов исследования

Группа пищевых продуктов	Подгруппа пищевых продуктов	Продукт	Навеска средней пробы
1. Сухие и пастообразные	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	2.1. Продукты с низким содержанием жира и органических кислот	Соки, пиво, квас, вино, безалкогольные напитки	2...10 мл
	2.2. Продукты с низким содержанием жира (менее 0,5%) и высоким содержанием органических кислот	Кисломолочные продукты	5...10 мл
	2.3. Продукты с высоким содержанием жира (более 0,5%) и низким содержанием органических кислот	Молоко	5...10 мл

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 шлифом (жидкий продукт вносят с помощью пипетки), вносят адипино-

вую кислоту (стандарт) в количестве 2...5 мг, взвешенную на аналитических весах с точностью до 0,0001 г на полиэтиленовой пластинке, приливают 5,0 мл этерифицирующей смеси и осуществляют процедуру этерификации. Для этого колбу с анализируемой смесью соединяют с обратным холодильником и выдерживают при температуре 60°C в течение 25...30 мин.

По окончании процедуры этерификации к содержимому колбы приливают 1,0 мл четыреххлористого углерода (или хлороформа), встряхивают в течение 30 с, добавляют 10 мл 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 мл гексана и проводят экстракцию с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин и отделением гексанового слоя. К осадку приливают 50 мл 80%-го водного раствора этанола, выдерживают в течение 40...60 мин, отделяют экстракт, переносят его в круглодонную колбу и упаривают на роторном испарителе при 60°C 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°C (в случае затруднений при упаривании в колбу добавляют 1,0 мл ацетона).

Пробу жидкого образца с высоким содержанием жира (подгруппа 2.3) перед упариванием предварительно обезжиривают. Для этого проводят трижды экстракцию гексаном (по 10 мл) 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°C.

К сухому остатку приливают 5 мл этерифицирующей смеси и далее проводят процедуру этерификации.

Подготовка хроматографической колонки

Подготовка хроматографической колонки осуществляется специалистом.

Навеску инертного носителя-сорбента Хромосорб-В в количестве 50 г взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г в круглодонной колбе, приливают 200 мл этанола, в котором предварительно растворено 0,5 мл о-фосфорной кислоты, тщательно перемешивают, выдерживают в течение 2...3 ч и спирт отгоняют на роторном испарителе при температуре 80°C до сухого состояния сорбента. К высушенному сорбенту приливают 200 мл 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°C, 2 ч при 120°C, 4 ч при 180°C, 8 ч при 200°C.

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°C со скоростью 6...10°C/мин, температура испарителя 220°C, температура пламенно-ионизационного детектора 210°C, расход газа-носителя 30...40 мл/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 еди-

ницах; S – 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.

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.

8.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 8.2.1

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%-й 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 8.2 лабораторного журнала.

Таблица 8.2 – Навески образцов и стандарта для исследования кислотного состава сухофруктов

Образец	Масса навески, мг
Образец 1	
Образец 2	
Стандарт:	
в образце 1	
в образце 2	

К содержимому колб приливают по 5,0 мл этерифицирующей смеси. Каждую колбу соединяют с обратным холодильником и выдерживают при температуре 60°C в течение 25...30 мин. Затем колбы охлаждают до комнатной температуры, в каждую приливают по 1,0 мл хлороформа, встряхивают в течение 30 с, добавляют по 10 мл 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°C со скоростью 6...10°C/мин, температура испарителя 220°C, температура пламенно-ионизационного детектора 210°C, расход газаносителя 30...40 мл/мин.

Идентификацию индивидуальных этиловых эфиров проводят по временам удерживания этиловых эфиров органических кислот-метчиков (лимонной, винной, яблочной, молочной, щавелевой) и методом добавки.

Содержание отдельных органических кислот (в %) в анализируемом образце определяют по формуле

$$C = \frac{A_1 \cdot C_{\text{ст}} \cdot 100 \cdot K}{A_c \cdot C},$$

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 (X) результатов двух параллельных определений, которое округляют до трехзначной цифры. Результаты определений вносят в таблицу 8.3.

Таблица 8.3 – Результаты анализа кислотного состава сухофруктов

Кислота	Образец 1		Образец 2	
	Площадь пика	Содержание кислоты, %	Площадь пика	Содержание кислоты, %

Лабораторная работа 8.2.2

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%-й 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 мл средней гомогенизированной пробы молока и взвешивают на аналитических весах (с точностью до 0,0001 г). В колбу с образцом мо-

лока вносят 2,5...3,0 мг адипиновой кислоты (стандарта), взвешенной на аналитических весах с точностью до 0,0001 г на полиэтиленовой пластинке. Точные значения навесок образца и стандарта вносят в таблицу 8.4.

Таблица 8.4 – 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 мл ацетона).

Отмеренные с помощью пипетки 7 мл средней гомогенизированной пробы кефира взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,0001 г в центрифужной пробирке, в которую вносят также взвешенную на аналитических весах адипиновую кислоту, (2,5...3,0 мг). Точные значения навесок образца и стандарта вносят в таблицу 8.5.

Пробу кефира перед упариванием предварительно обезжиривают путем трехкратной экстракции. Для этого к содержимому центрифужной пробирки трижды добавляют по 20 мл 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°C.

Для проведения процедуры этерификации к сухому остатку каждой колбы приливают по 5,0 мл этерифицирующей смеси, колбы соединяют с обратными холодильниками и выдерживают при температуре 60°C в течение 25...30 мин. Затем их охлаждают до комнатной температуры, в каждую приливают по 1,0 мл хлороформа, встряхивают в течение 30 с, добавляют по 10 мл дистиллированной воды, повторно встряхивают в течение 30 с, содержимое колб переносят в де-

лительные 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°C со скоростью 6...10°C/мин, температура испарителя 220°C, температура пламенно-ионизационного детектора 210°C, расход газа-носителя 30...40 мл/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

$$C = \frac{A_1 \cdot C_{\text{ст}} \cdot 100 \cdot K}{A_c \cdot C},$$

где C – содержание молочной кислоты в навеске, %; K – поправочный коэффициент для молочной кислоты; $C_{\text{ст}}$ – 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.

Контрольные вопросы

1. Характеристика пищевых кислот.
2. В состав каких пищевых объектов входят кислоты?
3. Сформулируйте основные цели применения кислот в качестве пищевых добавок.

4. Метод, используемый для определения общего содержания веществ, имеющих кислотный характер.
5. Сущность метода 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?

Тестовые задания

1. Цель добавления кислот в пищевую систему:

- А) придать определенный вкус;
- Б) придать цвет;
- В) изменить вязкость в присутствии загустителя;
- Г) повлиять на коллоидные свойства.

2. Для регулирования рН используют кислоты:

- А) уксусную;
- Б) лимонную;
- В) соляную;
- Г) янтарную.

3. Пищевые добавки являются:

- А) пищевым продуктом;
- Б) компонентом пищи;
- В) непищевым продуктом;
- Г) источником энергии.

Тема 9

ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

В современной пищевой промышленности применяются различные способы улучшения качества продуктов и совершенствуются технологические процессы. Наиболее экономически выгодным и легко применяемым является использование пищевых добавок. Применение пищевых добавок имеет длинную историю, насчитывающую несколько тысячелетий. Еще в доисторические времена люди использовали поваренную соль и коптильный дым в качестве консервантов, древние египтяне применяли при приготовлении пищи уксус и мед, древние римляне стабилизировали вина сернистым ангидридом.

Широкое использование пищевых добавок началось в XIX веке, однако лишь во второй половине XX века они заняли устойчивое положение в пищевой промышленности как важнейшие пищевые микроингредиенты.

Пищевые добавки – это природные или синтетические вещества, которые намеренно вносят в пищевые продукты для выполнения определенных технологических функций.

Такие вещества, называемые также **прямыми пищевыми добавками**, не являются посторонними, как, например, различные загрязнители.

Основными целями введения пищевых добавок являются следующие:

- совершенствование технологии подготовки, переработки пищевого сырья, изготовления, фасовки, транспортировки и хранения продуктов питания;
- увеличение стойкости продуктов питания;
- создание и сохранение структуры пищевого продукта;
- сохранение или изменение органических свойств и внешнего вида продуктов.

При этом пищевые добавки не должны маскировать последствий использования испорченного сырья, проведения технологических операций в антисанитарных условиях и нарушения технологической дисциплины.

Пищевая добавка не применяется, если не достаточно аргументирована технологическая потребность в ней и конечная цель (выпуск продукции) может быть достигнута другими способами. Пищевые

добавки в предлагаемых дозах не должны представлять опасности для здоровья потребителя, и их использование не вводить его в заблуждение. Важнейшим условием обеспечения безопасности пищевых продуктов является соблюдение допустимой нормы суточного потребления пищевых добавок (ДСП).

Комплексные пищевые добавки – смеси, состоящие из двух или более пищевых добавок, на основе ароматизатора и вкусовых веществ (соль, сахар, пищевые кислоты, усилители вкуса и аромата и т.д.).

Эффективность использования пищевых добавок требует создания технологии их подбора и внесения с учетом особенностей химического строения, функциональных свойств и характера действия пищевых добавок, вида продукта, особенностей сырья, состава пищевой системы, технологии получения готового продукта, типа оборудования. Пищевые добавки должны вноситься в пищевые продукты в минимально необходимом для достижения технологического эффекта количестве, но не более установленных Санитарными правилами пределов.

В настоящее время разработана рациональная система цифровой кодификации пищевых добавок с литерой «Е». Она включена в кодекс для пищевых продуктов ФАО/ВОЗ. Каждой пищевой добавке присвоен цифровой трех- или четырехзначный номер. Они используются в сочетании с названиями функциональных классов, отражающих группировку пищевых добавок по технологическим функциям.

9.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 9.1.1

Определение содержания нитратов и нитритов в продовольственном сырье и пищевых продуктах

Нитраты – соли азотной кислоты HNO_3 – являются нормальным продуктом обмена азотистых веществ любого живого организма, растительного и животного происхождения. Нитраты сами по себе не обладают выраженной токсичностью, но при потреблении их в повышенных количествах (допустимая суточная доза нитратов для взрослого человека составляет 325 мг) частично восстанавливаются в пищеварительном тракте до нитритов, которые при поступлении в кровь могут вызвать метгемоглобинемию. Кроме того, из нитритов в

присутствии аминов могут образоваться N-нитрозамины, обладающие канцерогенной активностью.

Источниками нитратов являются практически исключительно растительные продукты и вода.

Предельно допустимые концентрации нитратов в растительных продуктах приведены в таблице 9.1

Таблица 9.1 – Предельно допустимые концентрации нитратов в растительных продуктах

Продукт	ПДК нитратов, мг/кг, не более	Примечание
Картофель	250	
Капуста белокочанная:		
ранняя (до 1 сентября)	900	
поздняя	500	
Морковь:		
ранняя	400	
поздняя	250	
Томаты	150	
Огурцы	150 (300) ^x	^x - защищенный грунт
Свекла столовая	1400	
Лук репчатый	80	
Лук-перо	600 (800) ^x	^x - защищенный грунт
Листовые овощи (салаты, шпинат, щавель, капуста, петрушка, сельдерей, кинза, укроп и т.п.)	2000 (3000) ^x	^x - защищенный грунт
Дыни	90	
Арбузы	60	
Перец сладкий	200 (400) ["]	^x - защищенный грунт
Кабачки	400	
Тыква (для изготовления консервов для питания детей)	200	
Яблоки	60	
Груши	60	
Виноград столовых сортов	60	

Определение NO_3^- с помощью нитратомера

Определение содержания нитратов в экстрактах растительных продуктов можно проводить на нитратомере НМ-002, предназначенном для экспресс-анализа концентрации нитратов методом прямой потенциометрии с помощью электродной системы, включающей мембранный ионоселективный нитратный и вспомогательный электроды.

Сущность метода состоит в извлечении нитратов из исследуемого материала раствором алюмокалиевых квасцов с последующим измерением их концентрации и полученной вытяжки с помощью ионоселективного электрода.

1. Приготовление растворов

1. Приготовление экстрагирующего раствора (раствора I) с массовой долей, алюмокалиевых квасцов 1%.

Раствор готовят из расчета 10 г алюмокалиевых квасцов, взвешенных с погрешностью 0,1 г на 1000 мл раствора.

2. Приготовление раствора концентрации $C(\text{NO}_3^-) = 0,1$ моль/л (раствора II).

Раствор, приготовленный из расчета 10,11 г азотнокислого калия, высушенного до постоянной массы при температуре $(105 \pm 5)^\circ\text{C}$, взвешенного с погрешностью не более 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и растворяют в экстрагирующем растворе, доводя объем до метки.

Растворы I и II хранят в посуде с притертой пробкой не более 1 года.

3. Приготовление раствора концентрации $C(\text{NO}_3^-) = 0,01$ моль/л, т.е. раствора $pC_{\text{NO}_3^-} = 2$.

Готовят 10-кратным разбавлением раствора II экстрагирующим раствором (раствором I) $pC_{\text{NO}_3^-} = 3$.

Готовят 10-кратным разбавлением раствора $pC_{\text{NO}_3^-}=2$ экстрагирующим раствором в день проведения анализа.

4. Приготовление раствора концентрации $C(\text{NO}_3^-) = 0,0001$ моль/мл, т.е. раствора $pC_{\text{даз}} = 4$.

Готовят 10-кратным разбавлением раствора $pC_{\text{NO}_3^-}=3$ экстрагирующим раствором в день проведения анализа.

2. Подготовка проб для анализа

Пробы для анализа измельчают с помощью терки. Зеленые культуры режут ножницами или ножом до частиц размером 0,5–1,0 см. 10 г измельченного материала взвешивают с точностью до первого десятичного знака, помещают в стакан гомогенизатора, наливают 50 см раствора алюмокалиевых квасцов с массовой долей 1% (раствор I) и гомогенизируют в течение 1 мин при частоте вращения 6000 мин⁻¹.

3. Калибровка нитратомера с электродной системой

Электроды перед началом работы необходимо выдержать в дистиллированной воде объемом не менее 50 мл в течение 5 мин, после чего сменить дистиллированную воду и вторично выдержать в таком же объеме не менее 5 мин.

Калибровку следует начинать в растворе с наименьшей концентрацией $pC_{NO_3} = 4$.

Промытые дистиллированной водой и протертые электроды поместить в раствор $pC_{NO_3} = 4$.

Через 1,5–2 мин при нажатой кнопке «О» установить на ЖКИ, отжать кнопку «О».

Регулировкой «K1» установить на ЖКИ «03,5».

Вынуть электроды из раствора, промыть дистиллированной водой, протереть и поместить в раствор $pC_{NO_3} = 2$.

Нажать кнопку «О».

Через 1,5–2 мин считать и записать значение приращения э.д.с. электродной системы в растворе $pC_{NO_3} = 2$ по сравнению с раствором $pC_{NO_3} = 4$.

Отжать кнопку «О».

Регулировкой «K2» установить на ЖКИ «350».

Вынуть электроды из раствора, поместить в дистиллированную воду объемом не менее 50 мл и промыть в ней до показаний нитратомера НМ-002 менее «01,0». При необходимости сменить дистиллированную воду и повторить промывку. Электроды протереть и поместить в контрольный раствор $pC_{NO_3} = 3$.

Отжать кнопку «О».

Считать показания нитратомера.

В контрольном растворе pC_{NO_3} после калибровки на ЖКИ должно высвечиваться «35,0 ± 04,2».

Приращение э.д.с. указанной электродной системы при переходе от раствора с $pC_{NO_3} = 4$ к раствору с pC_{NO_3} или от раствора с pC_{NO_3} к

раствору с $pC_{NO_3} = 2$ должно составлять не менее 53 м^3 при температуре 25°C .

4. Проведение измерений

Измерения в пробах проводят откалиброванной с нитратометром электродной системой, выполняя следующие требования:

- перед помещением в пробу электроды тщательно промывают дистиллированной водой и протирают; при разном переходе от больших концентраций к малым качество промывки контролируют по показаниям нитратометра НМ-002 в дистиллированной воде (промывают до значения менее «01,0»);

- показания считывают по истечении времени их установления через $1,5 \pm 2,5$, при отжатой кнопке «О»;

- при изменении температуры проб или растворов более чем на $\pm 2^\circ\text{C}$ проводят перекалибровку;

- при перегрузке нитратометра (слишком большом значении концентрации азота нитратов в контролируемой пробе) пробу следует 10-кратно разбавить экстрагирующим раствором алюмокалиевых квасцов, результат измерений при этом следует умножить на 10;

- причиной нестабильности показаний нитратометра в пробе могут быть различные мешающие физико-химические процессы в системе проба – электрод, малая ионная сила раствора пробы, в этом случае рекомендуется непрерывное помешивание пробы при измерениях или проведении измерений в отфильтрованной пробе, для поддержания ионной силы необходимо добавлять рекомендуемой методикой экстрагирующий раствор.

5. Обработка результатов

Массовую долю нитратов в испытуемых пробах в мг/кг определяют используя таблицы для перевода величин pC_{NO_3} в массовую долю нитратов.

1. Перевод величины pC_{NO_3} в массовую долю нитрата (мин^{-1} , мг/кг) при анализе арбузов, дынь, огурцов, лука-пера, столовой капусты (анализа вытяжки 1 : 5).

pC _{NO₃}	Сотые доли pC _{NO₃}									
	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09
1,6	9188	8979	8775	8575	8380	8189	8003	7821	7643	7469
1,7	7299	7133	6970	6812	6656	6505	6357	6212	6071	5933
1,8	5798	5666	5537	5411	5287	5167	5049	4935	4822	4712
1,9	4605	4500	4398	4298	4200	4104	4011	3920	3830	3743
2,0	3658	3575	3493	3414	3336	3260	3186	3113	3043	2973
2,1	2906	2840	2775	2712	2650	2590	2531	2473	2417	2362
2,2	2308	2256	2204	2154	2105	2057	2010	1964	1920	1876
2,3	1833	1792	1751	1711	1672	1634	1597	1560	1525	1490
2,4	1456	1423	1391	1359	1328	1298	1268	1239	1211	1184
2,5	1157	1130	1105	1080	1055	1031	1007	985	962	940
2,6	919	898	877	858	838	819	800	782	764	747
2,7	730	712	697	681	666	650	636	621	607	593
2,8	580	567	554	541	529	517	505	493	482	471
2,9	461	450	440	430	420	410	401	392	383	374
3,0	366	357	349	341	334	326	319	311	304	297
3,1	291	284	277	271	265	259	253	247	242	236
3,2	231	226	220	215	210	206	201	196	192	188
3,3	183	179	175	171	167	163	160	156	152	149
3,4	146	142	139	136	133	130	127	124	121	118
3,5	116	113	110	108	105	103	101	98	96	94
3,6	91,9	89,8	87,7	85,8	83,8	81,9	80,0	78,2	76,4	74,7
3,7	73,0	71,3	69,7	68,1	66,6	65,0	63,6	62,1	60,7	59,3
3,8	58,0	56,7	55,4	54,1	52,9	51,7	50,5	49,3	48,2	47,1
3,9	46,1	45,0	44,0	43,0	42,0	41,0	40,1	39,2	38,3	37,4
4,0	36,6	35,7	34,9	34,1	33,4	32,6	31,9	31,1	30,4	29,7

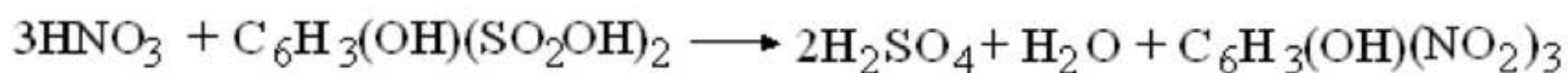
2. Перевод величины pC_{NO₃} в массовую долю нитрата (мин⁻¹, мг/кг) при анализе картофеля, моркови, столовой свеклы, лука-репки (анализ вытяжки 1 : 5).

pC _{NO₃}	Сотые доли pC _{NO₃}									
	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09
1,6	9033	8827	8626	8430	8238	8050	7867	7688	7513	7342
1,7	7175	7012	6852	6696	6544	6375	6249	6107	5968	5832
1,8	5699	5570	5443	5319	5598	5079	4964	4851	4740	4633
1,9	4527	4424	4323	4225	4129	4035	3943	3853	3765	3680
2,0	3596	3514	3434	3356	3280	3205	3132	3061	2991	2923
2,1	2856	2791	2728	2666	2605	2546	2488	2431	2376	2322
2,2	2269	2217	2167	2117	2069	2022	1976	1931	1887	1844
2,3	1802	1761	1721	1682	1644	1606	1570	1534	1499	1465
2,4	1432	1399	1367	1336	1306	1276	1247	1218	1191	1164
2,5	1137	1111	1086	1061	1037	1013	990	968	946	924
2,6	903	883	863	843	824	805	787	768	751	734
2,7	717	701	685	670	654	639	625	611	597	588
2,8	570	557	544	532	520	503	496	485	474	463
2,9	458	442	432	422	413	403	394	385	377	368
3,0	360	351	343	336	328	320	313	306	299	292
3,1	286	279	273	267	261	255	249	243	238	232
3,2	227	222	217	212	207	202	198	193	189	184
3,3	180	176	172	167	164	161	157	153	150	146
3,4	143	140	137	134	131	128	125	122	119	116
3,5	114	111	109	106	104	101	99	97	95	92
3,6	90,3	88,3	863	84,3	82,4	80,5	78,7	76,9	75,1.	73,4
3,7	71,7	70,1	68,5	67,0	65,4	63,9	62,5	61,1	59,7	58,3
3,8	57,0	55,7	54,4	53,2	52,0	50,8	49,6	48,5	47,4	46,3
3,9	45,3	44,2	43,2	42,2	41,3	40,3	39,4	38,5	37,7	36,8
4,0	36,0	35,1	34,3	33,6	32,8	32,0	31,3	30,6	29,9	29,2

Определение NO₃⁻ калориметрическим методом

Сущность калориметрического метода определения заключается в том, что присутствующие в воде нитраты взаимодействуют с фе-

нолдисульфокислотой, образуя нитросоединения желтого цвета в щелочной среде:



Определению мешают ионы Cl^- , NO_2^- при концентрации более $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, повышенная цветность. Цветные воды обрабатывают 5%-м раствором сульфата серебра, определив предварительно их концентрацию в исследуемой воде NO_2^- , переходят в NO_3^- кипячением пробы водной вытяжки с 0,5 мл 30%-го раствора перекиси водорода. Из результата определения нитратов вычитают содержание нитритов.

Реактивы: фенолдисульфокислота; стандартный раствор нитрата калия (прил. 4); Ag_2SO_4 – раствор, 1 мл которого соответствует 1 мг Cl^- иона. Навеску 0,574 г химически чистого сульфата серебра растворить в 100 мл дистиллированной воды; NaOH или KOH (40%-й раствор).

Методика проведения анализа

В две фарфоровые чашки отмерить соответственно 100 мл исследуемой воды и 100 мл рабочего стандартного раствора нитрата калия. Чашки поместить на водяную баню и выпарить досуха. В каждую чашку прилить из пипетки 1 мл фенолдисульфокислоты и сразу же растереть стеклянной палочкой (палочку оставить в чашке). Через 10 мин в каждую чашку внести по 15 мл дистиллированной воды (для разбавления образовавшейся серной кислоты) и 30 мл 40%-го раствора NaOH или KOH. Появление желтого окрашивания указывает на наличие в воде нитратов. Полученные окрашенные растворы перенести в мерные колбы на 50 или 100 мл (в зависимости от содержания нитратов).

Фарфоровые чашки и стеклянные палочки несколько раз ополоснуть дистиллированной водой, которую тоже вылить в мерные колбы с растворами. После этого сразу же приступить к колориметрированию на ФЭК-М с синим светофильтром. Замеры произвести 2–3 раза. Результаты записать.

Расчет: содержание NO_3^- иона (в $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$) вычислить по формуле

$$X_{\text{NO}_3^-} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot D_1}{D_2},$$

где $C_{\text{ст}}$ – концентрация NO_3^- иона в рабочем стандартном растворе, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$; D_1 – оптическая плотность исследуемого раствора; D_2 – оптическая плотность стандартного раствора.

Примечание. Определять NO_3^- можно и визуальными колориметрическими методами.

Лабораторная работа 9.1.2

Определение нитритов в колбасных изделиях

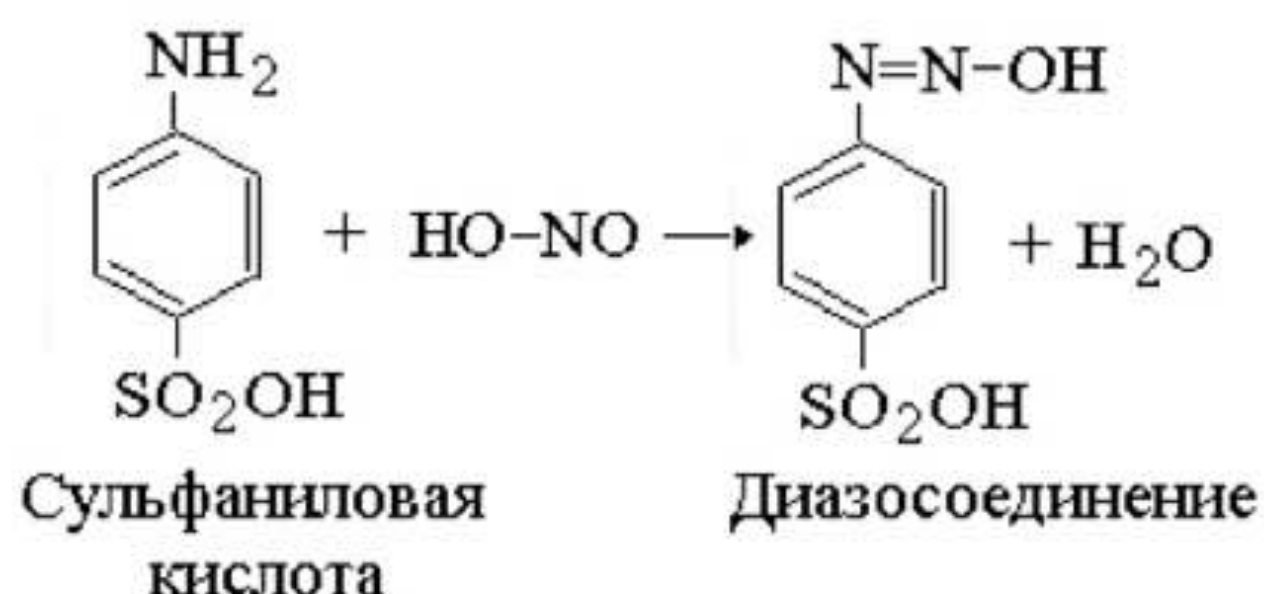
Нитраты и нитриты широко используют в ряде стран при производстве многих мясопродуктов. Их добавляют при приготовлении колбасных и копченых изделий, сосисок, некоторых мясных консервов, а также в посолочные смеси при посоле мяса как консервирующие вещества и с целью достижения необходимых технологических показателей: красно-розовой окраски, вкуса.

Вводимые в колбасный фарш нитраты в результате жизнедеятельности бактерий восстанавливаются до нитритов. Нитриты, взаимодействуя с миоглобином, образуют нитрозомиоглобин (неявляющийся канцерогеном!), сообщаящие колбасным изделиям стойкий розово-красный цвет. Нитриты дают больший антимикробный эффект, чем нитраты.

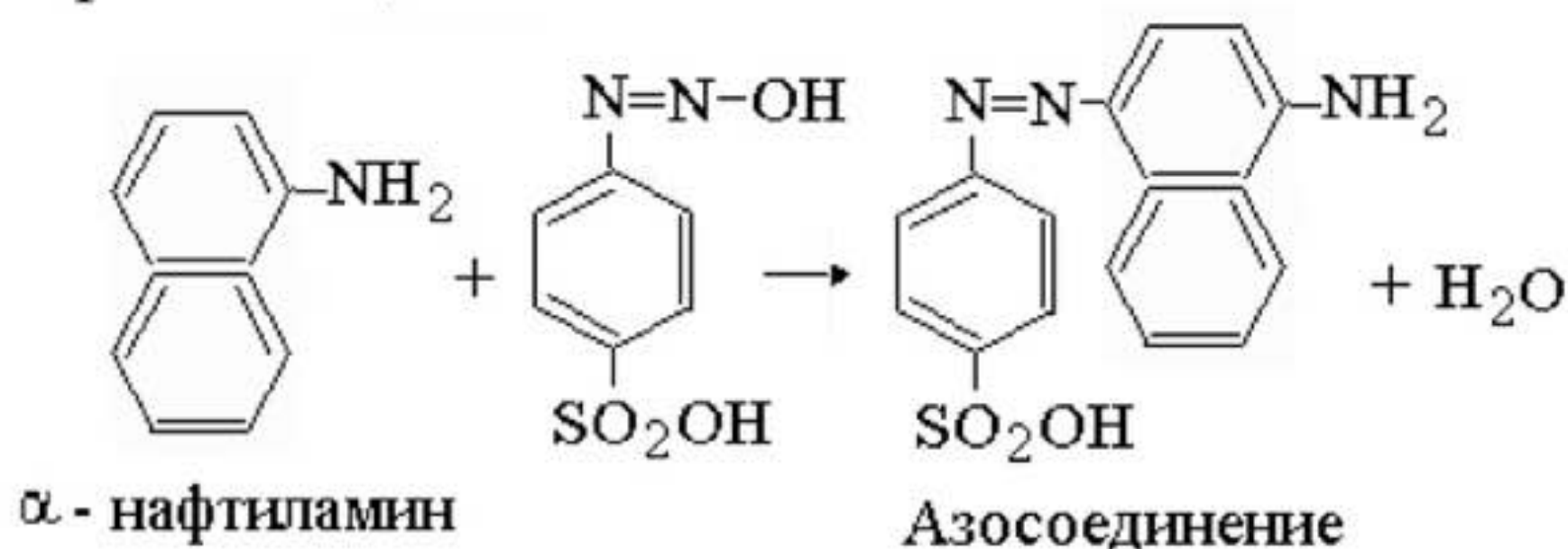
Однако нитриты более токсичные соединения, чем нитраты. А также являются предшественниками N-нитрозосоединений, образующихся при производстве и хранении мясопродуктов. Такие двойственные свойства нитритов обуславливают необходимость особой аккуратности при работе с ними: строгой дозированности, равномерности распределения в массе фарша, а также контроля над приготовлением раствора, его введением в фарш и сроками хранения.

В России до настоящего времени разрешено использование только нитрата натрия в количестве 70...75 мг/кг при условии, что его остаточное количество не превысит 50 мг/кг готового продукта. В ряде зарубежных стран в качестве консервантов используют как нитраты, так и нитриты, причем в каждой стране приняты свои нормы внесения этих веществ. В директивах Европейского совета по применению пищевых добавок указано максимально допустимое количество нитратов, равное 250 мг/кг готового продукта, при вводимом – 300 мг/кг.

Определение нитритов проводят методом, основанным на реакции Грисса–Илосвая, на образовании азотсоединения красного цвета при взаимодействии нитритов с реактивом Грисса (сульфоная кислота и α -нафтиламин). В кислой среде, создаваемой уксусной кислотой, нитриты взаимодействуют с сульфониловой кислотой, образуя диазосоединение.



Последнее вступает в реакцию с α -нафтиламином, образуя азосоединение красного цвета.



1. Подготовка к анализу

Для приготовления рабочего раствора 10 мл основного раствора переносят в мерную колбу объемом 500 мл и доводят до метки. Для приготовления образцового раствора нитрата натрия 5 мл рабочего раствора переносят в мерную колбу объемом 100 мл и доводят водой до метки, 1 мл образцового раствора содержит 0,001 мг, или 1 мкг нитрата натрия.

Подготовительный этап заканчивается построением градуировочного графика. Для этого в 6 мерных колб по 100 мл пипеткой вносят рабочий раствор: 0, 1, 2, 4, 6, 8. В первую колбу рабочий раствор не вносят, используя ее как контрольную. В каждую колбу добавляют 5 мл 3н. раствора аммиака, 10 мл 0,1 н. раствора HCl, доводят водой до метки, и перемешивают. В конические колбы (100 мл) пипеткой переносят по 10 мл приготовленных растворов, 15 мл реактива Грисса и после 15 мин выдержки при комнатной температуре измеряют интенсивность

розовой окраски на фотоэлектрокалориметре с зеленым светофильтром в кювете с толщиной светопоглощающего слоя 2 см.

Проводят три серии измерений. По полученным средним данным из 3 серий строят на миллиметровой бумаге градуировочный график. На оси абсцисс отмечают величины концентрации нитрита натрия (мкг/мл), на оси ординат – соответствующие значения оптической плотности.

Методика проведения анализа

С колбасных изделий снимают оболочку, затем пробу дважды измельчают на мясорубке. В химический стакан помещают 110 г колбасного фарша. Заливают 20 мл дистиллированной воды, нагретой до 55°C, и настаивают, периодически помешивая, в течение 10 мин. Затем вытяжку фильтруют через ватный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Навеску несколько раз промывают и переносят на фильтр, где еще раз промывают водой, затем раствор охлаждают и доводят водой до метки.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мл вытяжки, добавляют 10 мл раствора NaOH, 40 мл раствора сульфата цинка для осаждения белков. Смесь нагревают 7 мин на кипящей водяной бане, после чего охлаждают, доводят до метки водой, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Параллельно проводят контрольный анализ на реактивы, помещая в мерную колбу вместо вытяжки воду.

В коническую колбу (100 мл) помещают 5 мл фильтрата, 1 мл раствора аммиака, 2 мл раствора соляной кислоты, 2 мл дистиллированной воды и для усиления окраски 5 мл образцового раствора нитрита натрия, содержащего 1 мкг на 1 мл. Затем в колбу приливают 15 мл реактива Грисса и через 15 мин измеряют интенсивность окраски на фотокалориметре с зеленым светофильтром в кювете с толщиной поглощающего слоя 2 см в отношении раствора сравнения.

Массовую долю нитрата вычисляют по формуле

$$X = \frac{M \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 30}{m \cdot 20 \cdot 5 \cdot 10},$$

где X – массовая доля нитрита, %; M – массовая концентрация нитрат-иона, мкг/мл; г; m – масса навески колбасного изделия, г.

Контрольные вопросы

1. Дайте характеристику загрязнителей, подлежащих контролю в различных группах продовольственного сырья.
2. В чем заключается токсичное, канцерогенное, мутагенное и тератогенное действие ряда компонентов пищевых продуктов?
3. Приведите примеры токсичных элементов пищи.
4. Влияние различных видов технологической обработки на образование в пищевых продуктах нежелательных компонентов.
5. Какие опасности для человека влечет попадание пестицидов и гербицидов, нитратов и нитритов в пищевые продукты?

Тестовые задания

1. Пищевые добавки с индексом Е подразумевают, что вещество проверено:

- А) на безопасность;
- Б) чистоту;
- В) пищевую ценность;
- Г) калорийность.

2. Пищевые добавки классифицируются на вещества:

- А) улучшающие внешний вид продукта;
- Б) регулирующие консистенцию;
- В) понижающие срок хранения пищевого продукта;
- Г) регулирующие вкус продукта.

3. Регулируют вкус пищевых продуктов:

- А) стабилизаторы;
- Б) ароматизаторы;
- В) вкусовые добавки;
- Г) подслащивающие вещества.

4. Улучшают внешний вид продукта:

- А) ароматизаторы;
- Б) красители;
- В) отбеливатели;
- Г) кислоты.

5. Регулируют консистенцию пищевых продуктов:

- А) гелеобразователи;
- Б) загустители;
- В) отбеливатели;
- Г) эмульгаторы.

6. Увеличивают сохранность пищевых продуктов:

- А) пенообразователи;
- Б) стабилизаторы;
- В) консерванты;
- Г) антиоксиданты.

7. Использование пищевых добавок не должно:

- А) увеличить степень риска;
- Б) оказывать неблагоприятное действие на здоровье;
- В) снизить пищевую ценность;
- Г) изменить цвет продукта.

8. Пищевой ценностью нутрицевтики:

- А) обладают;
- Б) не обладают.

9. Биологической активностью парафармацевтики

- А) обладают;
- Б) не обладают.

10. Нутрицевтики – это:

- А) витамины;
- Б) ПНЖК;
- В) алкалоиды;
- Г) микроэлементы.

11. Парафармацевтики – это:

- А) витамины;
- Б) органические кислоты;
- В) флавоноиды;
- Г) алкалоиды.

Тема 10.

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
- иммуноферментными методами.

Химические методы являются в настоящее время наиболее распространенными и состоят из двух стадий: выделения и количественного определения микотоксинов.

1. *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.

2. *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 **радиоиммунно-химические и иммунноферментные 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, различных лабораторных животных, 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).

Ионометрия – метод анализа, связанный с применением ионоселективных 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 ионоселективных 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.

Ионоселективным 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 мл. Исходным раствором являются 0,1000 М NaNO_3 , приготовленный по точной навеске в мерной колбе вместимостью 500 мл.

Таблица 10.1 – Потенциалы индикаторного электрода в растворах NaNO_3 с различной концентрацией ионов NO_3^-

Электродный потенциал, мВ	$C(\text{NO}_3^-)$, моль/л						
	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	10^{-1}
	$\lg C(\text{NO}_3^-)$						
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 таблицу 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 углеводородов

Эти методы включают хроматографические и оптические методы исследования. Они предусматривают стадию выделения, идентификации и количественного определения углеводородов с применением газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для определения полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) рекомендован метод низкотемпературной спектрофлуориметрии.

10.1.4. Методы определения тяжелых металлов

Для определения тяжелых металлов применяют **метод переменноточковой полярографии**. Этот метод также может быть использован при постановке лабораторных работ (п. 10.2).

Метод основан на сухой минерализации проб пищевых продуктов или напитков и дальнейшем определении исследуемых ионов в растворе минерализата полярографически в режиме переменного тока.

Полярография – электрохимический метод анализа, основанный на изучении поляризационных кривых.

Полярография постоянного тока (классическая)

Полярографическая 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.

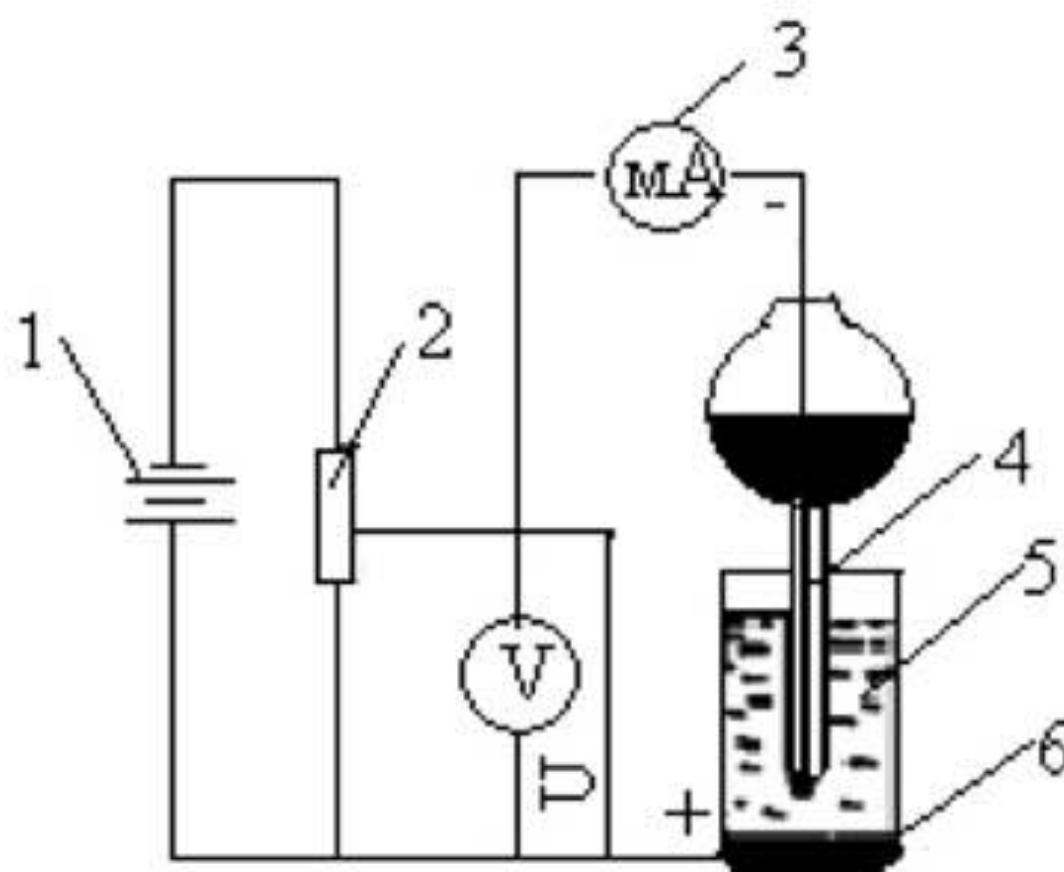


Рисунок 10.1 – Принципиальная схема полярографической установки

Наложенное на электрохимическую ячейку напряжение вызывает поляризацию анода и катода:

$$E = \varphi_a - \varphi_k - iR,$$

где i – сила тока; R – сопротивление раствора; φ_a и φ_k – потенциалы анода и катода.

Если уменьшить сопротивление раствора, добавив сильный электролит (фон), то величина iR (падение потенциала в растворе) будет настолько малой, что ею можно пренебречь.

Потенциал анода практически остается постоянным во время электролиза, так как плотность тока мала и относительно большая поверхность анода не поляризуется. Тогда потенциал капающего поляризующегося катода с небольшой поверхностью будет $E = -\varphi_k$

Полярографические данные получают путем измерения тока, проходящего через электрохимическую ячейку, как функции потенциала, налагаемого на электроды. Графическую зависимость силы тока от потенциала называют полярографической волной (рис. 10.2).

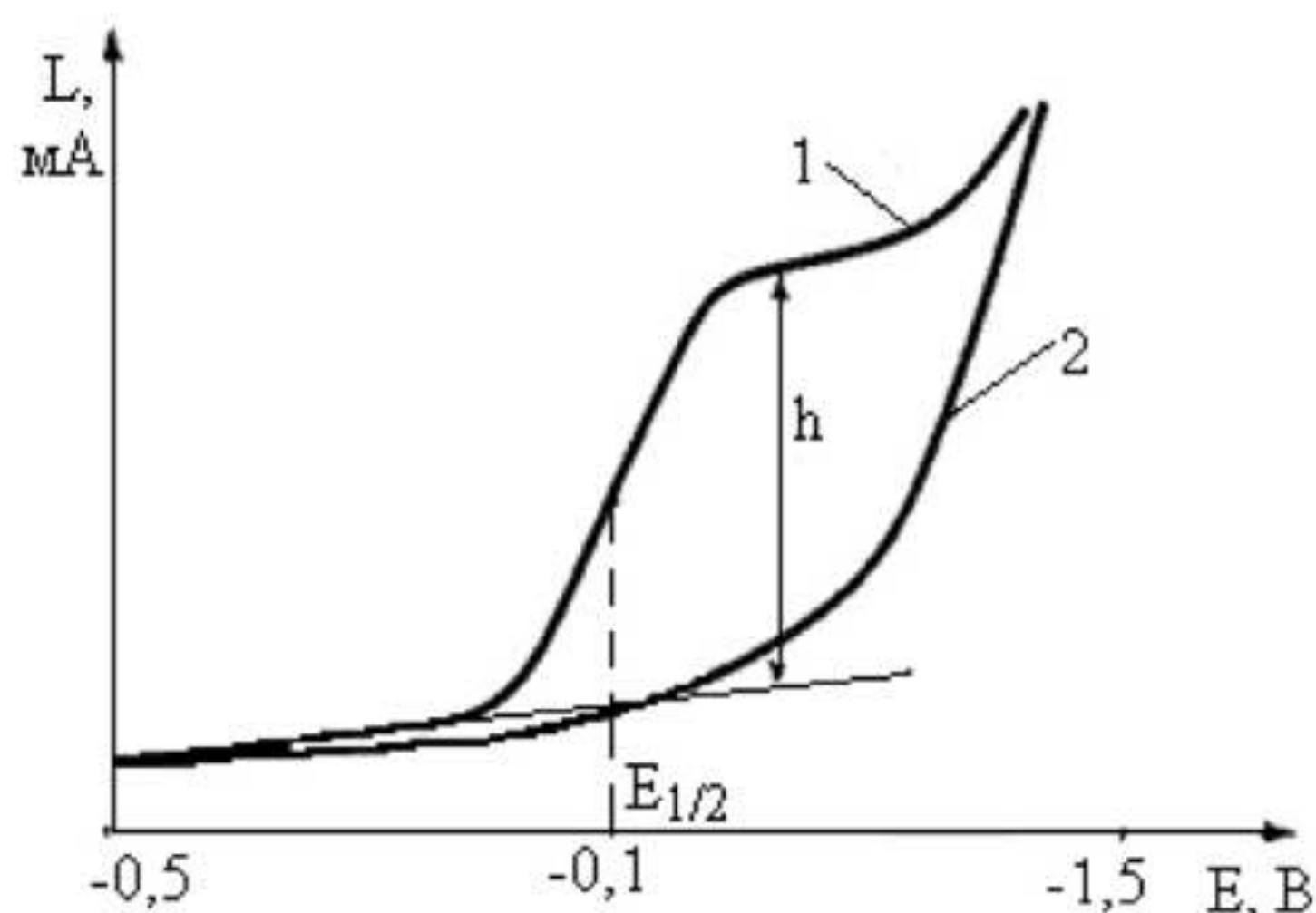
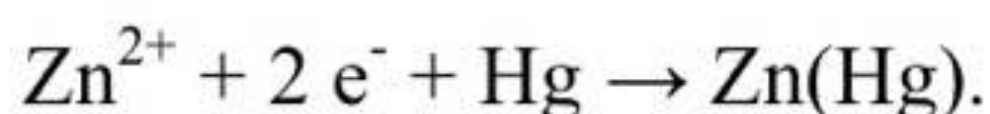


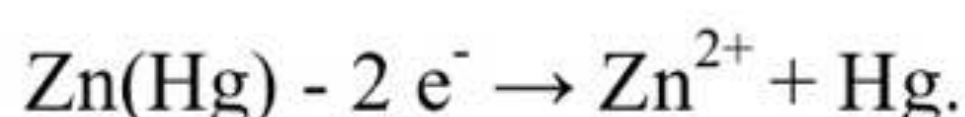
Рисунок 10.2 – Полярограмма $1 \cdot 10^{-3}$ раствора хлорида цинка:
а – в 1 М растворе хлорида калия; б – в 1 М раствора хлорида калия (2)

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 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 1 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...1000 раз превышающей концентрацию определяемого вещества. Такой электролит называют фоном. Его создают в исследуемом растворе для увеличения электро-

проводности 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.

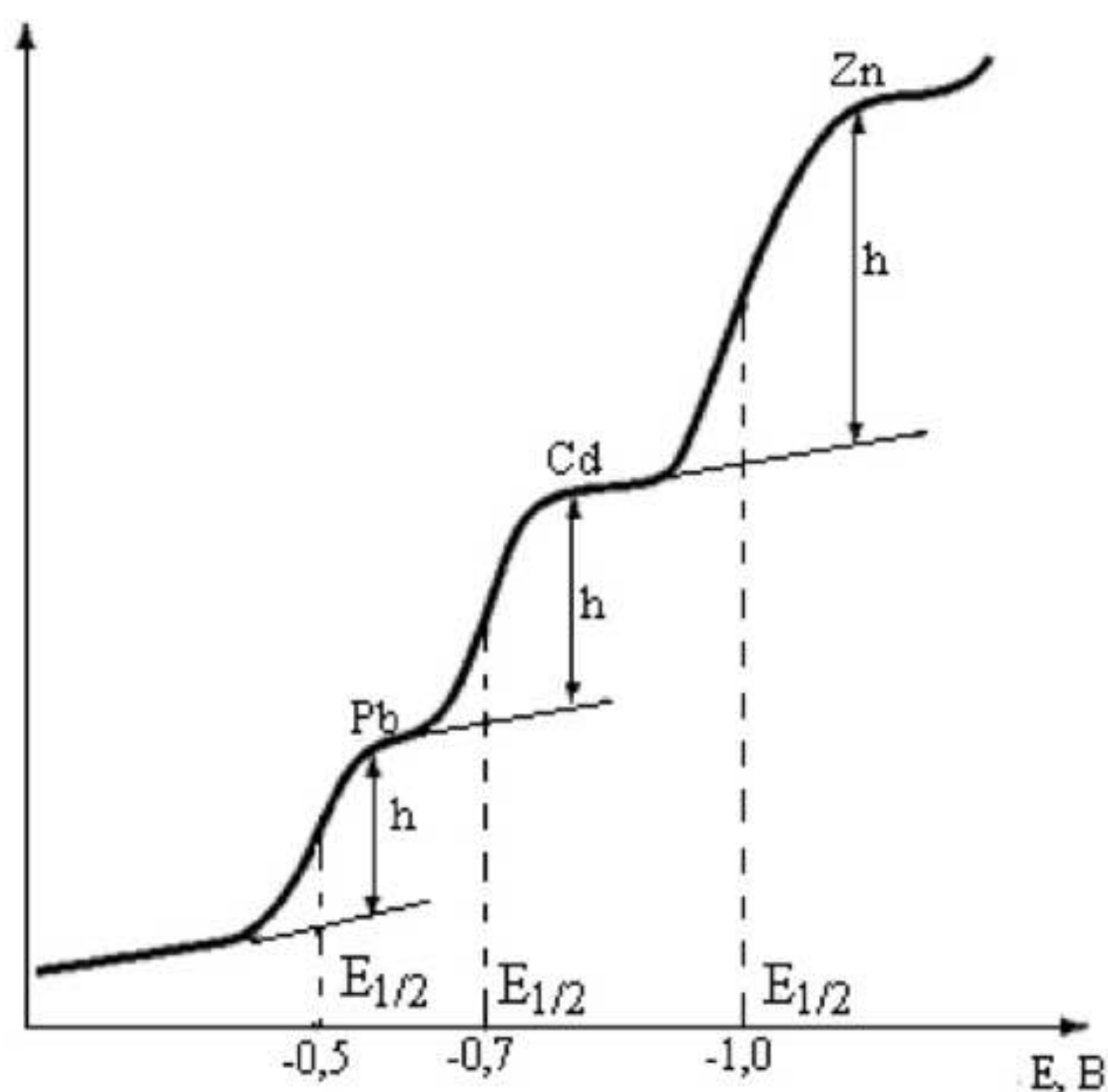


Рисунок 10.3 – Полярограмма раствора, содержащего ионы свинца, кадмия и цинка. Фон – 1 М раствор хлорида калия

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 полуволны постоянноточковой полярограммы.

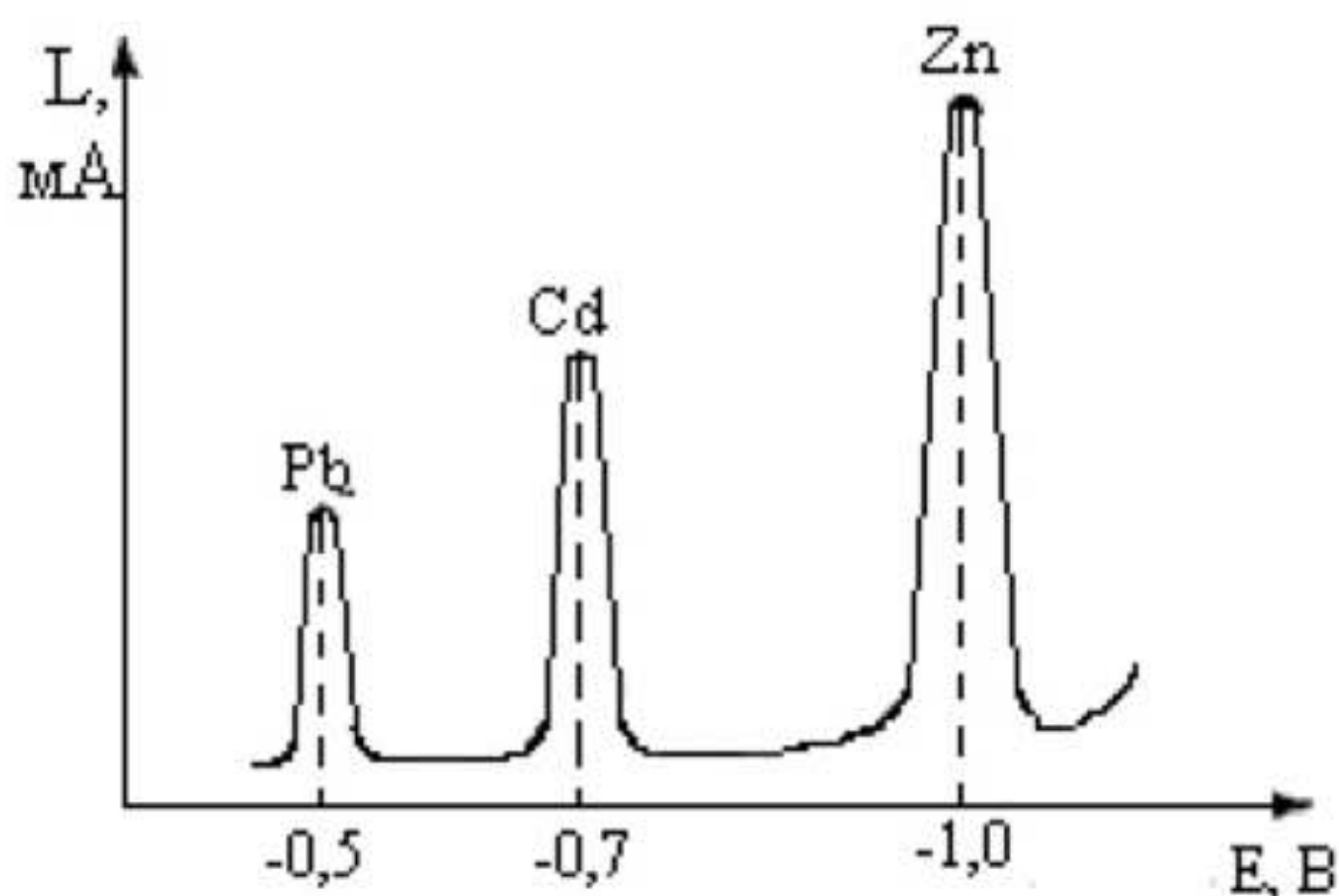


Рисунок 10.4 – Переменноточковая полярограмма раствора, содержащего ионы свинца, кадмия и цинка. Фон – 1 М раствор хлорида калия

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 ($m^{2/3} \cdot t^{1/6}$), то концентрацию C_x определяемого элемента можно вычислить расчетным методом, используя уравнение Ильковича:

$$i_\eta = 607 \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot C_x,$$

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/л.

10.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 10.2.1

Определение тяжелых металлов в пищевом сырье и пищевых продуктах методом переменноточковой полярографии

Токсичные элементы (в частности, некоторые тяжелые металлы) составляют обширную и весьма опасную в токсикологическом отношении группу веществ. Обычно рассматривают 14 элементов: Hg, Pb, Cd, As, Sb, Sn, Zn, Al, Be, Fe, Cu, Ba, Cr, Tl.

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: полярографПУ-1; азотная кислота концентрированная; азотная кислота, раствор 1:1; хлороводородная кислота, 0,1 М раствор; основной стандартный раствор меди, $c(\text{Cu}) = 1$ мг/мл; основной стандартный раствор свинца, $c(\text{Pb}) = 1$ мг/мл;

основной стандартный раствор кадмия, $c(\text{Cd}) = 1 \text{ мг/мл}$; основной стандартный раствор цинка, $c(\text{Zn}) = 1 \text{ мг/мл}$; 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:

Сырье, пищевые продукты	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 мл концентрированной азотной кислоты и упаривают досуха.

Б. Плоды, 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...60°C.

Затем пипеткой или мерным цилиндром отмеривают пробы, помещают в тигли. Пробы ставят на электроплитку со слабым нагревом и упаривают досуха (не допуская разбрызгивая). 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 мл 0,1 М НСl, охлаждают и фильтруют в мерный цилиндр вместимостью 10 мл через обеззоленный фильтр, предварительно промытый фоновым электролитом (0,1 М НСl). Смывают тигель малыми порциями (2 мл) фонового электролита и доводят объем раствора до 10 мл.

Проведение полярографирования

Измерение проводят на полярографе в режиме переменного тока с ртутно-капельным электродом в электролизере вместимостью 20 мл.

В электролизер вносят испытуемый раствор (9 мл), 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, мл; C_d – концентрация металла в добавке, мкг/мл; V_x – объем исследуемого раствора, взятый для полярографирования, мл; V_0 – общий объем раствора, приготовленный из озоленной навески, мл; m – навеска образца, взятая на озоление, г.

Результаты определений вносят в таблицу 10.2.

Таблица 10.2 – Содержание тяжелых металлов в пищевом сырье и пищевых продуктах

Образец	Номер тигля	Элемент	h_1	h_2	V_0	V_x	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. П 1.5) и делают вывод о соответствии исследуемых продуктов критериям безопасности по тяжелым металлам.

Контрольные вопросы

1. Сущность полярографического метода анализа. Преимущества метода полярографии.
2. Перечислите индикаторные электроды, применяемые в полярографии. Их преимущества и недостатки.
3. Сущность качественного и количественного полярографического анализа. Какие существуют методы количественных определений?
4. Поясните, с чем связана способность пектинов связывать ионы тяжелых металлов
5. Сущность фотоколориметрического определения содержания меди.

Тестовые задания

1. Основными критериями токсичности являются:

- А) период полураспада;
- Б) ЛД₁₀₀;
- В) аминокислотный скор;
- Г) ЛД₅₀.

2. Основные токсикологические критерии:

- А) ДСД;
- Б) аминокислотный скор;
- В) ПДК;
- Г) ДСП.

3. Метаболизм ксенобиотиков включает:

- А) энергетические превращения;
- Б) метаболические превращения;
- В) реакции конвертации;
- Г) реакции конъюгации.

4. Механизм детоксикации ксенобиотиков состоит из фаз:

- А) 2;
- Б) 3;
- В) 4;
- Г) 5.

Тема 11.

ПИЩЕВАЯ ЦЕННОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

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 2Н. 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 требова-

ниями 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

Пищевое вещество	Теплота сгорания ¹		Энергия окисления у человека		Стандарт торговый фактор версии	
	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 калориметре.

² 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

$$\mathcal{E} = K_{\text{б}} \cdot m_{\text{б}} + K_{\text{ж}} \cdot m_{\text{ж}} + K_{\text{у}} \cdot m_{\text{у}} + K_{\text{кисл}} \cdot m_{\text{кисл}}$$

где \mathcal{E} – энергетическая ценность пищевого продукта, ккал/100г; $K_{\text{б}}$, $K_{\text{ж}}$, $K_{\text{у}}$, $K_{\text{кисл}}$ – коэффициенты энергетической ценности, ккал/г (см. табл. 11.1); $m_{\text{б}}$, $m_{\text{ж}}$, $m_{\text{у}}$, $m_{\text{кисл}}$ – массовая доля белков жиров, углеводов, органических кислот, г/100 г.

Расчет энергетической ценности алкогольных напитков, обусловленной этанолом, производят по формуле

$$\mathcal{E} = \frac{\text{Объем} \cdot \text{Крепость (об,\%)}}{100 \cdot 0,8 \cdot 7},$$

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

$$\text{СЭ} = (\text{ВОО} \cdot \text{КФА}) + \text{ПТ},$$

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 году ФАО/ВОЗ предложили формулы для расчета величины ВОО, которые приведены в таблице 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.

11.1. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Составление карты пищевой и энергетической ценности пищевых продуктов

Цель работы: овладеть методикой расчета пищевой и энергетической ценности продуктов на основании их химического состава.

В соответствии с вариантом, предложенным преподавателем, рассчитать пищевую и энергетическую ценность продуктов питания. На основании рецептуры и химического состава ингредиентов определить расчетным путем химический состав продуктов, составить карту пищевой и энергетической ценности пищевого суточного рациона. Сделать выводы о том, насколько данный продукт удовлетворяет суточной потребности в основных пищевых веществах, энергии. Сделать необходимые рекомендации.

Пример. Составить карту энергетической и пищевой ценности творожной массы с изюмом, приготовленной по следующей рецептуре, кг:

Творог жирный с массовой долей жира 18 %.....	373,75.
Сливки сухие с массовой долей жира 42 %.....	316,35.
Сахар-песок.....	180,90.
Изюм	100,00.
Желатин.....	9,00.
Вода.....	20,00.
Всего.....	1000,00.

Для определения энергетической ценности творожной массы необходимо знать ее химический состав, который можно определить расчетным методом, исходя из состава ингредиентов, по справочнику «Химический состав российских пищевых продуктов».

Белковый состав творожной массы:

$$\text{Творог жирный} \dots\dots\dots \frac{375,75 \cdot 15}{100} = 56,06 \text{ кг.}$$

$$\text{Сливки сухие} \dots\dots\dots \frac{316,35 \cdot 19}{100} = 60,11 \text{ кг.}$$

$$\text{Изюм} \dots\dots\dots \frac{100,0 \cdot 1,8}{100} = 1,80 \text{ кг.}$$

$$\text{Желатин.....} \frac{9,0 \cdot 87,2}{100} = 7,85 \text{ кг.}$$

Массовая доля белка в творожной массе составляет

$$\frac{(56,06 + 60,11 + 1,8 + 7,85) \cdot 100}{1000} = 12,58 \text{ \%}.$$

Углеводный состав творожной массы:

$$\text{Творог жирный.....} \frac{373,75 \cdot 2,8}{100} = 10,47 \text{ кг.}$$

$$\text{Сливки сухие.....} \frac{316,35 \cdot 30,2}{100} = 95,54 \text{ кг.}$$

$$\text{Сахар-песок.....} \frac{180,90 \cdot 99,7}{100} = 180,36 \text{ кг.}$$

$$\text{Изюм} \frac{100,0 \cdot 66}{100} = 66,00 \text{ кг.}$$

$$\text{Желатин.....} \frac{9,0 \cdot 0,7}{100} = 0,06 \text{ кг.}$$

Массовая доля углеводов в творожной массе составляет

$$\frac{(10,47 + 95,54 + 180,36 + 66 + 0,06) \cdot 100}{1000} = 35,24 \text{ \%}.$$

Жировой состав творожной массы:

$$\text{Творог жирный.....} \frac{373,75 \cdot 18}{100} = 67,28 \text{ кг.}$$

$$\text{Сливки сухие.....} \frac{316,35 \cdot 42}{100} = 132,87 \text{ кг.}$$

$$\text{Желатин.....} \frac{9,0 \cdot 0,4}{100} = 0,04 \text{ кг.}$$

Массовая доля жира в творожной массе составляет

$$\frac{(67,28 + 132,87 + 0,04) \cdot 100}{1000} = 20,02 \text{ \%}.$$

Аналогичным образом можно определить *массовую долю других нутриентов (органических кислот и минеральных веществ), %:*

$$\text{Органические кислоты} 0,96.$$

Кальций.....	0,28.
Фосфор.....	0,26.
Калий.....	0,36.

На основании расчетных данных массовых долей основных нутриентов и данных энергетических коэффициентов можно вычислить *энергетическую ценность* творожной массы по формуле

$$\text{Э} = 4,0 \cdot 12,58 + 9,0 \cdot 20,02 + 4,0 \cdot 35,24 + 3,6 \cdot 0,96 = 374,92 \text{ ккал/100 г.}$$

Пищевую ценность творожной массы определить, исходя из формулы сбалансированного питания, как процент удовлетворения суточной потребности человека в основных пищевых веществах, входящих в состав исследуемого продукта:

$$\text{Белки} \dots\dots\dots \frac{100 \cdot 12,58}{75} = 16,8 \, \%. \quad \text{Углеводы} \dots\dots\dots \frac{100 \cdot 35,24}{65} = 54,2 \, \%. \quad \text{Жиры} \dots\dots\dots \frac{100 \cdot 20,02}{83} = 24,1 \, \%. \quad \text{Органические кислоты} \dots\dots\dots \frac{100 \cdot 0,96}{2,0} = 48,0 \, \%. \quad \text{Кальций} \dots\dots\dots \frac{100 \cdot 0,28}{1,0} = 28,0 \, \%. \quad \text{Фосфор} \dots\dots\dots \frac{100 \cdot 0,26}{1,0} = 26,0 \, \%. \quad \text{Калий} \dots\dots\dots \frac{100 \cdot 0,36}{3,5} = 10,3 \, \%.$$

Таким образом, 100 г творожной массы удовлетворяют суточную потребность организма в белках на 16,8%, в углеводах на 54,2%, в жирах на 24,1%, в органических кислотах на 48%, в кальции на 28%, в фосфоре на 26%, в калии на 10,3%.

Полученные результаты оформить в виде таблицы.

Таблица 11.2 – Расчет пищевой и энергетической ценности продукта

Нутриент	Массовая доля в составе продукта, %	Энергетическая ценность продукта, ккал/100 г	Пищевая ценность (ПЦ) продукта	
			Суточная потребность	% удовлетворения суточной потребности
Белки				
Углеводы				
Жиры				
Органические кислоты				
Минеральные вещества				
В том числе:				
кальций				
фосфор				
калий				
и т.д.				
Витамины				
Всего				

Контрольные вопросы

1. Методы определения качества белка в пищевых продуктах.
2. Как рассчитать аминокислотный скор белков?
3. Дайте сравнительную характеристику качества растительного и животного белка. Факторы, влияющие на биологическую ценность белка.
4. Охарактеризуйте понятия «пищевая» и «энергетическая ценность» пищевых продуктов. Как рассчитываются данные показатели?

Тестовые задания

1. Биологическая ценность продукта определяется содержанием:

- А) белков;
- Б) воды;
- В) жиров;
- Г) углеводов.

2. Биологическая эффективность отражает:

- А) наличие высших жирных кислот;
- Б) сбалансированность жирнокислотного состава;
- В) наличие ПНЖК;
- Г) наличие углеводов.

3. Энергетическая ценность продукта показывает:

- А) количество ккал, высвобождающееся при окислении 100 г продукта;
- Б) количество кДж, высвобождающееся при окислении 100 г продукта;
- В) содержание жиров;
- Г) содержание витаминов.

4. Критерии оценки пищевой ценности продукта:

- А) биологическая ценность;
- Б) биологическая эффективность;
- В) перевариваемость;
- Г) безопасность.

5. Пищевой продукт является источником нутриента, если он покрывает потребность на%:

- А) 5...10;
- Б) 10...20;
- В) 70...90;
- Г) 20...50.

6. Продовольственное сырье – это продукт происхождения:

- А) синтетического;
- Б) растительного;
- В) животного;
- Г) микробиологического.

7. Относятся к пищевым продуктам следующие:

- А) продукты детского питания;
- Б) продукты диетического назначения;
- В) пиво;
- Г) углекислый натрий.

8. Пищевые продукты классифицируются:

- А) по содержанию основных нутриентов;
- Б) агрегатному состоянию;
- В) способу приготовления;
- Г) происхождению.

9. Макронутриенты – это:

- А) жиры;
- Б) минеральные вещества;
- В) углеводы;
- Г) белки.

10. Микронутриенты – это:

- А) белки;
- Б) минеральные вещества;
- В) углеводы;
- Г) витамины.

11. Вещества, не являющиеся источником энергии:

- А) минеральные вещества;
- Б) углеводы;
- В) витамины;
- Г) белки.

Тема 12.

ОСНОВЫ ПИТАНИЯ И ПИЩЕВАРЕНИЯ

Процесс разрушения природных полимеров осуществляется в организме путем ферментативного гидролиза с помощью пищеварительных ферментов, именуемых гидролазами.

В деполимеризации белков, жиров, углеводов участвует три группы гидролаз: протеазы – ферменты, разрушающие белки, липазы – ферменты, расщепляющие жиры, амилазы – ферменты, расщепляющие углеводы. Ферменты образуются в специальных секреторных клетках пищеварительных желез и поступают внутрь пищеварительного тракта вместе со слюной и пищеварительными соками – желудочным, поджелудочным и кишечным, объем выделения которых составляет у человека около 7 литров в сутки. Наряду с ферментами, катализаторами биохимических процессов расщепления пищевых веществ, в состав пищеварительных соков входят вода, различные соли, слизь, способствующая лучшему передвижению пищи. Для эффективного пищеварения необходим набор ферментов, обеспечивающих комплексное действие, которые вырабатываются пищеварительными железами в зависимости от состава поглощаемой пищи.

Белки пищи, попадая в желудок, подвергаются гидролитическому распаду под действием пепсина желудочного сока с оптимумом действия pH 1,5...2,5. Пептиды, образовавшиеся в желудке, и белки, поступившие в двенадцатиперстную кишку в неперевааренном 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 происходят 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, химот-

рипсин – карбоксильными группами метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана.

Дальнейшее расщепление полипептидов происходит под действием карбоксипептидазы, аминопептидазы и дипептидаз. Последние два вида 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.

Процесс переваривания жиров осуществляется, главным образом, в тонком кишечнике липазой поджелудочной железы, которая только в кишечнике превращается в активную липазу. В присутствии желчных кислот и специального белка (колипазы) активная липаза катализирует гидролиз триацилглицерина с отщеплением крайних ацилов и образованием смеси свободных высших жирных кислот в виде мыл (калиевых и натриевых солей) и 2-моноацилглицеринов, которые эмульгируются при участии желчных кислот и всасываются кишечными клетками. Соли желчных кислот (производные холевой кислоты) поступают из печени в желчь, а с ней в верхнюю часть тонкого кишечника. После всасывания кислот и 2-моноацилглицеринов из эмульгированных капелек жира в нижнем отделе тонкого кишечника происходит обратное всасывание солей желчных кислот, которые возвращаются в печень и используются повторно. Желчные кислоты постоянно циркулируют между печенью и тонким кишечником. Они играют важную роль в усвоении не только триацилглицеринов, но и всех жирорастворимых компонентов пищи.

Из углеводов у человека перевариваются в основном полисахариды – крахмал, содержащийся в растительной пище, и гликоген, содержащийся в пище животного происхождения. Оба полисахарида полностью расщепляются ферментами желудочно-кишечного тракта до свободной Д-глюкозы. Процесс переваривания начинается во рту под действием амилазы слюны с образованием смеси, состоящей из мальтозы, глюкозы и олигосахаридов, а продолжается и заканчивается в тонком кишечнике под действием амилазы поджелудочной железы, поступающей в двенадцатиперстную кишку. Гидролиз пищевых дисахаридов – сахарозы, лактозы, мальтозы – катализируют ферменты, находящиеся в наружном слое эпителиальных клеток, выстилаю-

щих тонкий кишечник. В эпителиальных клетках тонкого кишечника Д-фруктоза, Д-галактоза, Д-манноза частично превращаются в Д-глюкозу. Смесь простых гексоз поглощается выстилающими тонкий кишечник эпителиальными клетками и доставляется кровью в печень.

За исключением большей части триацилглицеринов, питательные вещества поглощаются в кишечном тракте, поступают в печень, которая является основным центром распределения питательных веществ, где сахара, аминокислоты и некоторые липиды подвергаются дальнейшим превращениям и распределяются между разными органами и тканями.

12.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 12.1.1

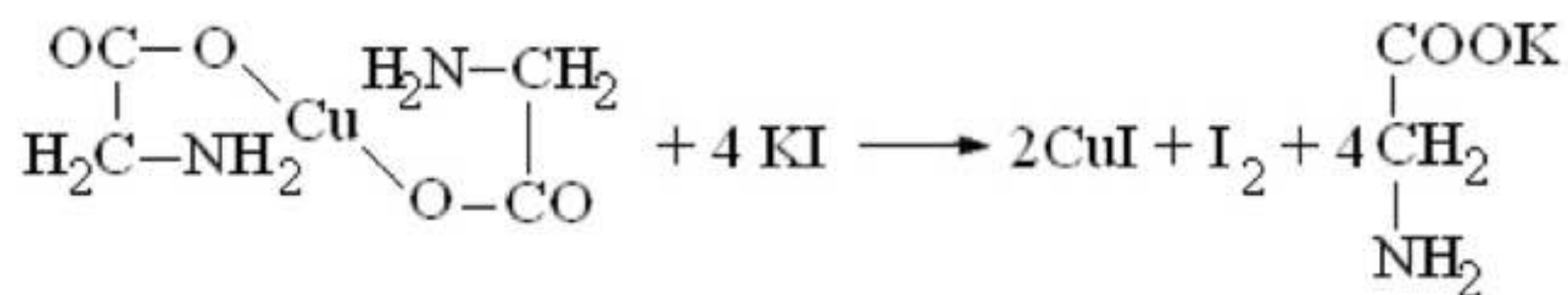
Гидролитическое расщепление белка ферментами поджелудочной железы

Цель работы: освоение метода гидролитического расщепления белка ферментами поджелудочной железы *in vitro*.

Определив содержание азота ос-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 ос-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%-й раствор;
- панкреатин (препарат поджелудочной железы): 2 г препарата растворяют в 20 мл 1%-го раствора гидрокарбоната натрия. Раствор фильтруют;
- хлорная медь: 27,3 г соли растворяют в мерной колбе на 1 л и доводят водой до метки; натрий фосфорнокислый трехзамещенный ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): 68,5 г соли растворяют в мерной колбе на 1 л и доводят водой до метки;
- боратный буфер (pH8,8): 28,6 г буры (тетраборнокислого натрия) растворяют в 750 мл воды в мерной колбе на 1 л, прибавляют 50 мл 1 н. раствора соляной кислоты и доводят водой до метки; суспензия фосфорнокислой меди в боратном буфере: 100 мл раствора хлорной меди смешивают с 200 мл раствора трехзамещенного фосфорнокислого натрия и добавляют 200 мл боратного буферного раствора. Суспензию готовят не более чем на один день. Тимолфталейн: 0,25 г индикатора растворяют в 100 мл 50%-го этилового спирта; тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0,1 н. раствор. Перед употреблением из него готовят 0,01 н. раствор;
- крахмал, 0,5%-й раствор; йодистый калий (KI), 10%-й раствор, его готовят перед употреблением; уксусная кислота, концентрированная; трихлоруксусная кислота (ТХУ), 10%-й раствор; едкий натр, 1 н. раствор. Колбы конические на 50 мл; пипетки стеклянные на 2, 10, 20 мл; колбы мерные на 2,5 мл; капельницы стеклянные; баня водяная; термостат.

Методика проведения анализа

Нумеруют конические колбы емкостью по 50 мл. В колбы вносят по 2 мл 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 мл раствора желатина, в колбы 2 и 4 по 20 мл дистиллированной воды. Растворы во всех колбах перемешивают и немедленно отбирают из каждой колбы по 2...5 мл смеси в мерные колбы на 25 мл для определения азота аминокислот.

В каждую мерную колбу еще до внесения смеси наливают по 2 мл 10%-го раствора ТХУ для инаktivирования ферментов. В пер-

вую 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°C.

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 мл суспензии фосфорнокислой меди и тщательно перемешивают. Если весь объем суспензии прореагировал, добавляют еще 5 мл.

Содержимое 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 мл уксусной кислоты и 5 мл 10%-го 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 мл ферментного препарата. Разность в содержании азота аминокислот в колбах 3 и 4 указывает на количество азота свободных аминогрупп в 20 мл 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 мл (2 мл раствора панкреатина + 20 мл 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 мл 0,01 н. раствора тиосульфата натрия соответствует 0,28 мг азота аминокислот; 25 – объем мерной колбы, мл; 22 – объем раствора в конической колбе, мл; 2 – объем раствора, взятый из конической в мерную колбу, мл; 10 – объем фильтрата, используемый для титрования, мл; V – объем 0,01 н. раствора тиосульфата натрия, пошедший на титрование, мл.

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, pH среды и других факторов на накопление свободных аминокислот, с последующим оформлением результатов в виде графиков.

Лабораторная работа 12.1.2

Гидролитическое расщепление жира липазой

Одним из важнейших этапов пищеварения является гидролитическое расщепление жира под действием липазы поджелудочной железы.

В данной работе исследуется скорость реакций расщепления молочного жира с получением кривых процесса его гидролиза без активатора и с активатором фермента липазы (желчью).

Цель работы: освоение метода гидролитического расщепления жира липазой.

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; фенолфталин, 0,1%-й спиртовой раствор; гидроксид натрия, 0,1 н. раствор;

желчь; термостат; конические колбы на 100 мл; пипетки на 10 мл; капельницы; бюретки.

Методика проведения анализа

В две конические колбы на 100 мл отмеривают по 50 мл кипяченого молока, после чего добавляют по 2 мл 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 мл жидкости для титрования. Колбы с реакционной смесью переносят в термостат, нагретый до 37°C.

К отобраным 10 мл жидкости добавляют 10 мл 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 мл 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 мл. Вычерчивают кривые, характеризующие кинетику реакции гидролитического расщепления жира, катализируемой липазой, и липазой, активированной желчью.

Контрольные вопросы

1. 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. Сущность переваривания липидов в желудочно-кишечном тракте.
5. Ферменты, участвующие в переваривании липидов.
6. Сущность переваривания углеводов в желудочно-кишечном тракте.
7. Конечные продукты переваривания углеводов.

Тестовые задания

1. Пищеварительный канал имеет оболочки:

- А) среднюю мышечную;
- Б) внутреннюю слизистую;
- В) внешнюю мышечную;
- Г) наружную серозную.

2. pH желудочного сока составляет:

- А) 1...3; В) 4...5;
- Б) 3...4; Г) 5...6.

3. Группа ферментов желудка:

- А) полифенолоксидазы;
- Б) амилазы;
- В) протеазы;
- Г) липазы.

4. Желчь вырабатывается клетками:

- А) печени;
- Б) желчного пузыря;
- В) 12-перстной кишки;
- Г) поджелудочной железы.

5. Происходит гидролитическое расщепление в 12-перстной кишке:

- А) углеводов; В) витаминов;
- Б) жиров; Г) белков.

6. Происходит в тонком кишечнике:

- А) мембранное пищеварение;
- Б) всасывание питательных веществ;
- В) полостное пищеварение;
- Г) деструкция компонентов полостного пищеварения.

7. Объем жидкости, который может всасываться за 1 час в тонком кишечнике, л:

- А) 0,5...1; В) 2...3;
- Б) 1...1,5; Г) 4...5.

8. Пищеварение в толстом кишечнике:

- А) отсутствует;
- Б) осуществляется полностью;
- В) осуществляется неполностью.

9. Образуется в толстом кишечнике:

- А) глюкоза;
- Б) метан;
- В) органические кислоты;
- Г) углекислый газ.

10. Ядовитые вещества обезвреживаются:

- А) в печени;
- Б) селезенке;
- В) желудке;
- Г) 12-перстной кишке.

11. Ключевыми функциями кишечной микрофлоры являются:

- А) метаболизм желчных кислот;
- Б) синтез аминокислот;
- В) синтез витаминов В, Н, К;
- Г) утилизация токсичных продуктов.

12. Положения теории сбалансированного питания (по Покровскому):

- А) приток веществ соответствует их потере;
- Б) физиологически значимыми являются пищевые волокна;
- В) приток питательных веществ обеспечивается деструкцией пищевых структур;
- Г) не обязательное соблюдение режима питания.

13. Принципы рационального питания:

- А) баланс между поступающей энергией и ее затратами;
- Б) соблюдение режима питания;
- В) пища должна содержать пищевые вещества в достаточном количестве;
- Г) пища усваивается организмом и населяющими его бактериями.

14. Рекомендации по формированию пищевого рациона:

- А) ограничить потребление пищи;
- Б) снизить потребление соли до 6 г в сутки;
- В) снизить потребление животных жиров;
- Г) сократить потребление сахара.

15. Злаковые культуры и картофель должны обеспечивать поступление энергии более ...%:

- А) 30;
- В) 60;
- Б) 50;
- Г) 70.

16. Потребление овощей и фруктов должно составлять не менее г в сутки:

- А) 100;
- В) 400;
- Б) 200;
- Г) 800.

17. Функциональные продукты питания:

- А) поддерживают физиологические функции;
- Б) обладают пищевой ценностью;
- В) снижают риск возникновения заболевания;
- Г) повышают уровень холестерина в крови.

18. Функциональные продукты питания способствуют:

- А) сохранению костей;
- Б) обеспечивают энергией;
- В) нормализуют пищеварение;
- Г) вызывают авитаминоз.

19. Виды функциональных ингредиентов:

- А) пищевые волокна;
- Б) витамины;
- В) ВЖК;
- Г) минеральные вещества.

20. Традиционными продуктами массового назначения являются продукты:

- А) детского питания;
- Б) употребляемые ежедневно;
- В) систематического употребления, регулирующие обмен веществ;
- Г) диетического питания.

21. Нутриенты – это вещества:

- А) не усваиваются организмом;
- Б) биологически активные добавки;
- В) усваиваются организмом;
- Г) все попавшие в организм вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в науке о питании накопилось достаточное количество фундаментальных знаний, позволяющих шире рассматривать влияние пищевых веществ на всех этапах ассимиляции нутриентов как в норме, так и при различных патологиях. Для обеспечения нормальной жизнедеятельности организма необходимо определенное количество белка, жира, углеводов и энергии, а также в состав пищи обязательно должны входить незаменимые факторы питания, которые не синтезируются ферментными системами организма, к которым относятся незаменимые аминокислоты, некоторые жирные кислоты, витамины, минеральные вещества и микроэлементы.

Отдельные пищевые вещества – белки, жиры, углеводы, витамины, минеральные вещества – должны находиться в суточном рационе в строго определенных соотношениях. Для того чтобы соблюсти физиологические потребности человека в пищевых веществах и энергии, необходимо знание химического состава пищи

Приведенные в пособии методики позволят не только охарактеризовать качественные и количественные пропорции отдельных компонентов, но и их пищевую и биологическую ценность

Использование методик, изложенных в данном пособии, поможет студенту определить химический состав пищевых продуктов, ориентироваться в понимании значения каждого компонента пищи, особенностях превращений, составить сбалансированный по основным компонентам рацион, позволит квалифицированно управлять технологическим процессом, осуществлять контроль за правильностью использования рационов в целом.

Правильно организованное и построенное на современных научных основах питание будет способствовать обеспечению нормального течения процессов роста и развития организма, сохранению здоровья и трудоспособности человека.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Нечаев, А.П.* Пищевая химия / *А.П. Нечаев* [и др.]. – СПб.: Гиорд, 2004. – 640 с.
2. *Скурихин, И.М.* Все о пище с точки зрения химика / *И.М. Скурихин, А.П. Нечаев.* – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
3. Безвредность пищевых продуктов / под ред. *Г.Р. Робертса*; пер. с англ. – М.: ВО Агропромиздат, 1986. – 287 с.
4. Вода в пищевых продуктах / под ред. *Р.Б. Дауорта*; пер. с англ. – М.: Пищевая пром-сть, 1980. – 376 с.
5. *Дудкин, М.С.* Новые продукты питания / *М.С. Дудкин, Л.Ф. Щелкунов.* – МАЙК: Наука, 1998. – 303 с.
6. *Мосолов, В.В.* Протеолитические ферменты / *В.В. Мосолов.* – М.: Наука, 1971. – 414 с.
7. *Мосолов, В.В.* Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов / *В.В. Мосолов, Т.А. Валуева.* – М., 1993. – 207 с.
8. *Толстогузов, В.Б.* Новые формы белковой пищи / *В.Б. Толстогузов.* – М.: Агропромиздат, 1987. – 303 с.
9. Химический состав пищевых продуктов / под ред. *И.М. Скурихина, М.Н. Волгарева.* Кн. 1. Справ. табл. содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности пищевых продуктов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 224 с.
10. Химический состав пищевых продуктов / под ред. *И.М. Скурихина, М.Н. Волгарева.* Кн. 2. Справ. табл. содержания аминокислот, жирных кислот, витаминов, макро- и микроэлементов, органических кислот и углеводов. – М. Агропромиздат, 1987. – 360 с.
11. *Щербаков, В.Г.* Биохимия растительного сырья / *В.Г. Щербаков* [и др.]. – М.: Колос, 1999. – 376 с.
12. *Павлоцкая, Л.Ф.* Физиология питания / *Л.Ф. Павлоцкая, Н.В. Дуденко, М.М. Эйдельман.* – М.: Высш. шк., 1989. – 368 с.
13. *Соколова, Н.А.* Пищевая химия: метод. указания / *Н.А. Соколова, О.Г. Емельянова.* – Красноярск: КрасГАУ, 2000. – 48 с.
14. *Гамаюрова, В.С.* Пищевая химия: лабораторный практикум / *В.С. Гамаюрова, Л.Э. Ржещицкая.* – СПб.: ГИОРД, 2006. – 136 с.
15. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.21078-01. – М.: ФГУП «ИнтернСЭН», 2002. – 168 с.

16. Физиология питания, санитария и гигиена: учеб. пособие / *А.Н. Мартиничик, А.А. Королев, Л.С. Трофименко.* – М.: Центр Академия; Мастерство, 2002. – 192 с.
17. Практикум по биохимии: учеб. пособие / *А.А. Чиркин.* – Минск: Новое знание, 2002. – 512 с.
18. Лабораторный практикум по химии жиров / *Н.С. Арутюнян [и др.];* под. ред. *Н.С. Арутюнян, Е.П. Корненой.* – СПб.: ГИОРД, 2004. – 264 с.
19. *Ушанова, В.М.* Основы научных исследований / *В.М. Ушанова, О.И. Лебедева, А.Н. Девятловская.* Ч.1. – Красноярск: СибГТУ, 2004. – 360 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Приготовление буферных растворов

Таблица П1.1 – Глицин - HCl буфер (0,05 М), рН 2,2...3,6
Глицин, м.м. = 75,07

рН	0,2 М Глицин, мл	0,2М HCl, мл	H ₂ O, мл	рН	0,2 М Глицин, мл	0,2 М HCl, мл	H ₂ O, мл
2,2	50	44,0	До 200	3,0	50	11,4	До 200
2,4	50	32,4	Тоже	3,2	50	8,2	Тоже
2,6	50	24,2	» »	3,4	50	6,4	» »
2,8	50	16,8	» »	3,6	50	5,0	» »

Таблица П1.2 – Фосфатно-цитратный буфер, рН 2,2...8,0
Na₂HPO₄ • 2H₂O, м.м. = 178,05;
Лимонная кислота • H₂O, м.м. = 210,14

рН	0,2М Na ₂ HPO ₄ , мл	0,1 М Лимонная кислота, мл	рН	0,2 М Na ₂ HPO ₄ , мл	0,1 М Лимонная кислота, мл	рН	0,2 М Na ₂ HPO ₄ мл	0,1М Лимонная кислота, мл
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, рН 3,0...6,2**

Лимонная кислота • Н₂О, м.м. = 210,14;

Трехзамещенный цитрат натрия • 2Н₂О, м.м. = 294,12.

рН	0,1 М Лимонная кислота, мл	0,1 М Цитрат натрия трехзамещенный, мл	рН	0,1 М Лимонная кислота, мл	0,1 М Цитрат натрия трехзамещенный, мл
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 П1.4 – **0,2 М Ацетатный буфер, рН 3,6...5,8**

Ацетат натрия • 3Н₂О, м.м. = 136,09

рН	0,2 М ацетат натрия, мл	0,2 М Уксусная кислота, мл	рН	0,2 М ацетат на- трия, мл	0,2 М Уксусная кислота, мл
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Таблица П1.5 – **0,05 М Боратный буфер, рН9,3...10,1**

Бура (Na₂B₄O₇ • 2Н₂О), м.м. = 381,43

рН	0,05 М Бура, мл	0,2 М Натриевая щелочь, мл	Н ₂ О, мл	рН	0,05 М Бура, мл	0,2 М Натриевая щелочь, мл	Н ₂ О, мл
9,3	50	0,0	До 200	9,8	50	34,0	До 200
9,4	50	11,0	Тоже	10,0	50	43,0	Тоже
9,6	50	23,0	» »	10,1	50	46,0	» »

Таблица П1.6 – **0,1 М Фосфатный буфер, рН 5,8...8,0**

Двузамещенный фосфат натрия • 2H₂O, м.м. = 178,05;

Двузамещенный фосфат натрия • 12H₂O, м.м. = 358,22;

Однозамещенный фосфат натрия • H₂O, м.м. = 138,00;

Однозамещенный фосфат натрия • 2H₂O, м.м. = 156,03.

рН	0,2 М Дву- замещен- ный фосфат натрия, мл	0,2 М Од- нозамещен- ный фосфат натрия, мл	H ₂ O, мл	рН	0,2 М Дву- замещен- ный фосфат натрия, мл	0,2 М Од- нозамещен- ный фосфат натрия, мл	H ₂ O, мл
5,8	8,0	92,0	До 200	7,0	61,0	39,0	До 200
6,0	12,3	87,7	Тоже	7,2	72,0	28,0	Тоже
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 П1.7 – **0,05 М Фосфатный буфер, рН 5,8...8,0**

Однозамещенный фосфат калия, м.м. = 136,09

рН	0,2 М Одноза- мещенный фосфат калия, мл	0,2 М Натриевая или калиевая щелочь, мл	H ₂ O, мл	рН	0,2 М Одноза- мещенный фосфат калия, мл	0,2 М Натриевая или калиевая щелочь, мл	H ₂ O, мл
5,8	5,0	0,36	До 20	7,0	5,0	2,91	До 20
6,0	5,0	0,56	Тоже	7,2	5,0	3,47	Тоже
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 П1.8 – **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, мл	0,2 М Борная кислота, мл	рН	0,05 М Бура, мл	0,2 М Борная кислота, мл	рН	0,05 М Бура, мл	0,2 М Борная кислота, мл
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 П1.9 – 0,05 М Трис-буфер, рН 7,2...9,1
Трис м.м. = 121,14

рН		0,2 М Трис, мл	0,1 М НСІ, мл	Н ₂ О, мл	рН		0,2 М Трис, мл	0,1 М НСІ, мл	Н ₂ О, мл
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	Тоже	7,96	7,82	25	30,0	Тоже
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 П1.10 – 0,05 М Глициновый буфер, рН 8,6...10,6
Глицин, м.м. = 75,07

рН	0,2 М Глицин, мл	0,2 М Натриевая щелочь, мл	Н ₂ О, мл	рН	0,2 М Глицин, мл	0,2 М Натриевая щелочь, мл	Н ₂ О, мл
8,6	50	4,0	До 200	9,6	50	22,4	» »
8,8	50	6,0	Тоже	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 П2.1 – Раствор соляной кислоты

Плотность при 20 °С, г/мл	Концентрация HCl		Плотность при 20 °С, г/мл	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 П2.2 – Раствор серной кислоты

Плотность при 20 °С, г/мл	Концентрация H ₂ SO ₄		Плотность при 20 °С, г/мл	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 П2.3 – Раствор хлорной кислоты

Плотность при 20 °С, г/мл	Концентрация HClO ₄		Плотность при 20 °С, г/мл	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 П2.4 – Раствор уксусной кислоты

Плотность при 20°С, г/мл	Концентрация CH ₃ COOH		Плотность при 20°С, г/мл	Концентрация CH ₃ COOH	
	г/100 г раствора (вес.%)	моль/л		г/100 г раство- ра (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 1,0700г/мл 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 ПЗ.1 – Характеристики наиболее часто применяемых индикаторов

Наименование	pK	Интервал перехода окраски рН	Окраска в среде		Кон- цент- рация %	Растворитель
			кислой	щелочной		
1	2	3	4	5	6	7
Кристалл - фиолетовый		0,0...2,0	Зеленая	Фиолетовая	-	Вода
Тимоловый синий (1-й пе- реход)	1,7	1,2...2,8	Красная	Желтая	0,1	А. 20°-й спирт, Б. Вода с до- бавлением 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°-й спирт, Б. Вода с до- бавлением 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°-й спирт
Бромфеноло- вый спирт	3,8 7	3,0...4,6	Желтая	Синяя	0,1	А. 20°-й спирт, Б. Вода с до- бавлением 3,0 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Конго рот		3,0...5,2	Синяя	Красная		
Метиловый оранжевый	3,5	3,1...4,4	Красная	Оранжевая	0,1	Вода
Лакмус		5,0...8,0	Красная	Синяя		
Нейтральный красный		6,8...8,0	Красная	Янтарно- желтая	0,1	60°-й спирт

Окончание табл. ПЗ.1

1	2	3	4	5	6	7
Бромкрезоло- вый синий (бромкрезоло- вый зеленый)		3,8...5,4	Желтая	Синяя	0,1	А. 200 спирт, Б. Вода с до- бавлением 2,9 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Метиловый красный	5,0	4,4...6,2	Красная	Желтая	0,1 и 0,2	60°-й спирт
Бромтимоло- вый синий	7,0	6,0...7,6	Желтая	Синяя	0,05	А. 20°-й спирт, Б. Вода с до- бавлением 3,2 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Феноловый	7,8	6,8...8,0	Желтая	Красная	0,1	А. 20°-й спирт, Б. Вода с до- бавлением 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°-й спирт, Б. Вода с до- бавлением 5,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Тимоловый си- ний	8,9	8,0...9,6	Желтая	Синяя	0,1	А. 20°-й спирт, Б. Вода с до- бавлением 4,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
Тимолфталейн		9,3...10,5	Бесцвет- ная	Синяя	0,1	90°-й спирт
Ализаровый желтый		10,1...12, 1	Желтая	Оранжевая	0,1	Вода
Фенолфталейн	9,7	8,2...10,0	Бесцвет- ная	Пурпурная	0,1 и 1,0	60°-й спирт

Универсальные индикаторы

I. 0,1 г бромтимолового синего, 0,1 г метилового красного, 0,1 г нафтофталеина, 1,0 г фенолфталеина растворяют в 500 мл 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 мл 70%-го этилового спирта.

III. 0,04 г метилового оранжевого, 0,02 г метилового красного, 0,12 г нафтофталеина растворяют в 100 мл 70%-го этилового спирта.

Таблица ПЗ.2 – 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 мл и добавляют 250 мл дистиллированной воды.

Затем приливают 40 мл 10%-го раствора сульфата меди, перемешивают и добавляют 16 г гидрокарбоната натрия.

2-й раствор: 18 г Na_2SO_4 растворяют в 500 мл горячей дистиллированной воды. Раствор кипятят в течение 40 мин для удаления CO_2 , затем охлаждают.

Оба раствора смешивают в мерной колбе на 1 л, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. В течение первых двух-трех суток хранения реактива Шомадьи 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 мл и растворяют в 150 мл H_2O . Раствор перемешивают, к нему осторожно небольшими порциями добавляют 21 мл концентрированной H_2SO_4 (х. ч.) при непрерывном перемешивании.

3 г гептагидрата гидроортоарсената натрия ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) растворяют отдельно в химическом стаканчике в 50 мл H_2O 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°C 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 кругло-донную колбу и растворяют в 700 воды, прибавляют 50 мл 85%-й H_3PO_4 и 100 мл концентрированной HCl . Смесь кипятят с обратным холодильником 10 ч, затем добавляют 150 г Li_2SO_4 , 50 мл воды и не-

сколько 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... 10 мл). Затем переносят в мерную колбу на 200 мл 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 мл основного раствора йода разводят в мерной колбе на 100 мл 0,1 н. раствором HCl.

6. Антроновый реактив

200 мг антрона растворяют в 100 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84).

7. Стандартный раствор сахарозы

1,0000 г сахарозы взвешивают с точностью до 0,0002 г и растворяют в мерной колбе вместимостью 250 мл. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой.

8. 1%-й раствор дихромата калия

49 г дихромата калия растворяют при нагревании в 300 мл воды, отдельно в 300 мл воды медленно при перемешивании вводят 300 мл концентрированной H_2SO_4 и охлаждают. В мерную колбу вместимостью 1000 мл сначала помещают раствор дихромата калия, затем – серную кислоту, объем раствора доводят водой до метки, осторожно перемешивают.

9. Фенолдисульфокислота

5 г фенола помещают в круглодонную колбу, приливают 30 мл концентрированной серной кислоты (пл. 1,84). Колбу закрывают корковой пробкой с вставленным в нее обратным холодильником (стеклянная трубка длиной 60 см). Реакционную смесь нагревают 6 ч на водяной бане. Нижний конец стеклянной трубки должен находиться на уровне нижней поверхности пробки, чтобы пары воды не попадали в реакционную смесь. Образовавшуюся фенолдисульфокислоту переливают в склянку из темного стекла.

10. Стандартный раствор нитрата калия

0,1631 г химически чистого высушенного при 110°C нитрата калия растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л. Исходный стандартный раствор нитрата калия содержит 0,1 мг NO_3^- в 1 мл раствора. Рабочий стандартный раствор готовят, разбавляя исходный в 10 раз, непосредственно перед определением. К исходному стандартному раствору для консервации прибавляют 1 мл толуола на 1 л раствора.

Расчет количества сульфата аммония при фракционировании белков методом высаливания

Таблица П5.1 – Количество сухого сульфата аммония, которое необходимо добавлять к 100 мл раствора, г, при фракционировании белков методом высаливания при 0...4°C

Исходное насыщение, %	Конечное насыщение, %									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0	5,29	10,88	16,81	23,09	29,77	36,88	44,46	52,58	61,27	70,61
10	-	5,44	11,20	17,32	23,81	30,73	38,11	46,00	54,46	63,54
20	-	-	5,60	11,55	17,86	24,59	31,76	39,43	47,65	56,48
30	-	-	-	5,77	11,91	18,44	25,41	32,86	40,84	49,42
40	-	-	-	-	5,95	12,29	19,06	26,29	34,04	42,36
50	-	-	-	-	-	6,15	12,70	19,72	27,23	35,30
60	-	-	-	-	-	-	6,35	13,14	20,42	28,24
70	-	-	-	-	-	-	-	6,57	13,61	21,18
80	-	-	-	-	-	-	-	-	6,81	14,12
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,06

Предельно допустимые концентрации (ПДК)

Таблица П6.1 – 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 П6.2 – Предельно допустимые концентрации (ПДК) содержания нитратов в продуктах растениеводства

Продукт	Концентрация	Продукт	Концентрация
Картофель	250 500 250	Свекла	1400
Капуста		Салат	2000
Морковь		Яблоки	60

Таблица П7.1 – 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	99 100	176,2	175
							177,8	176,5