

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова»

Е. Ю. Егорова, Д. В. Минаков, А. А. Минакова, Г. С. Волкова

БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Учебно-методическое пособие

*для бакалавров направлений подготовки
19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья»
и 19.03.01 «Биотехнология» всех форм обучения*

ISBN 978-5-7568-1523-8



АлтГТУ
Барнаул • 2025

© Е. Ю. Егорова, Д. В. Минаков,
А. А. Минакова, Г. С. Волкова, 2025
© Алтайский государственный технический
университет им. И. И. Ползунова, 2025

УДК 577.1:581.19

ББК 28.572.5

Егорова, Е. Ю.

Биохимический анализ продуктов переработки растительного сырья: учебно-методическое пособие для бакалавров направлений подготовки 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология» очной и заочной форм обучения / Е. Ю. Егорова, Д. В. Минаков, А. А. Минакова, Г. С. Волкова; Алт. гос. техн. ун-т. им. И.И. Ползунова – Барнаул: Изд-во АлтГТУ, 2025. – 81 с. – URL: http://elibr.altstu.ru/uploads/open_mat/2025/EgMinMinVolk_BAPPRS_up.pdf. – Текст электронный.

ISBN 978-5-7568-1523-8

Авторы:

д-р техн. наук, доцент, заведующий кафедрой «Технология хранения и переработки зерна» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им И.И. Ползунова» **Егорова Е. Ю.**

д-р техн. наук, доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» **Минаков Д. В.**

канд. хим. наук, доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» **Минакова А. А.**

д-р техн. наук, заведующий отделом биотехнологии ферментов, дрожжей, органических кислот и биологически активных добавок Всероссийского научно-исследовательского института пищевой биотехнологии – филиала ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» **Волкова Г. С.**

Рецензенты:

Тихонов С. Л., д-р техн. наук., профессор, заведующий кафедрой Высшая школа биотехнологий ФГБОУ ВО «Уральский государственный лесотехнический университет»;

Шавыркина Н. А., канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им И.И. Ползунова».

В учебно-методическом пособии по темам изложен теоретический материал, определены порядок и содержательная часть выполнения лабораторных работ по дисциплинам «Биохимия», «Основы биотехнологии», «Основные вопросы пищевой биотехнологии», «Методы обработки растительного сырья». Рекомендовано Алтайским государственным университетом в качестве учебно-методического пособия (выписка из протокола заседания кафедры органической химии АлтГУ №7 от 13.05.2025).

Издано в авторской редакции.

Учебно-методическое пособие

Минимальные системные требования: Yandex (20.12.1) или Google Chrome (87.0.4280.141) и т.п., скорость подключения - не менее 5 Мб/с, Adobe Reader и т.п.

Дата подписания к использованию 23.06.2025 Объем издания – 1,7 Мб.

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова», 656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46, <https://www.altstu.ru>.

ISBN 978-5-7568-1523-8

© Е. Ю. Егорова, Д. В. Минаков, А. А. Минакова, Г. С. Волкова, 2025

© Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, 2025

[Вперед \(к оглавлению\)](#)

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ТЕМА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ВЛАГИ В ПРОДУКТАХ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ	5
ТЕМА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	15
ТЕМА 3. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ	24
ТЕМА 4. ФЕРМЕНТЫ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ.....	40
ТЕМА 5. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДОВ	53
ТЕМА 6. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЗЕРНА И МУКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ЗОЛЫ.....	70
7 ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В УЧЕБНОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	75
8 РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	78
9 ТРЕБОВАНИЯ К СТРУКТУРЕ И ОФОРМЛЕНИЮ ОТЧЁТОВ ПО ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ	79
ПРИЛОЖЕНИЕ А Титульный лист отчета по лабораторным работам	80

ВВЕДЕНИЕ

Целью учебно-методического пособия является формирование у студентов знаний о химическом составе растительного сырья, в частности зерна разных культур, плодов и ягод; об изменениях в химическом составе при переработке растительного сырья в продукты питания. Это должно помочь будущим специалистам рационально и грамотно организовывать и вести технологические процессы производства продуктов питания из растительного сырья, исключить нежелательные процессы, приводящие к ухудшению качества сырья и продуктов, и развивать положительные процессы, способствующие, в конечном итоге, повышению питательной ценности продуктов, лучшей их сохранности и более рациональному использованию.

Вспомогательная часть издания включает методологию работы с источниками литературы и нормативными документами, основные требования к содержанию и оформлению отчетов по лабораторным работам. Текст написан в формате технологий пищевых и перерабатывающих производств, с привлечением НТД, материалов современных периодических изданий, учебно-справочной и специальной литературы.

Пособие рассчитано на помощь студентам и преподавателю при выполнении лабораторных работ по дисциплинам **«Биохимия»**, **«Основы биотехнологии»**, **«Основные вопросы пищевой биотехнологии»**, **«Методы обработки растительного сырья»**, может быть использовано в качестве дополнительной литературы при изучении курсов данных дисциплин и написано в соответствии с требованиями ГОС ВО и Рабочих программ дисциплин, согласно ГОСТ 2.105–95 «Общие требования к текстовым документам» и СТО АлтГТУ 12 700–2013 «Лабораторные работы. Общие требования к организации и проведению занятий».

При освоении курсов дисциплин необходимо знать:

- строение, особенности, свойства различных природных органических веществ, содержащихся в растениях, (белков, ферментов, углеводов, нуклеиновых кислот, липидов, витаминов);
- особенности биохимических процессов, происходящих в растениях зерне при их росте и развитии (фотосинтез, дыхание);
- особенности биохимических процессов, происходящих при хранении растительного сырья (дыхание, брожение и их биохимическая связь);
- особенности биохимических процессов, происходящих при переработке растительного сырья в продукты питания;
- взаимосвязь и взаимопревращения природных органических веществ в растениях в процессах метаболизма.

ТЕМА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ВЛАГИ В ПРОДУКТАХ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Растительное сырье характеризуется принципиально отличающимся от других видов сырья разнообразием пластид – органелл клетки, состоящих из окруженной двумя липопротеидными мембранами белковой стромы и специализирующихся на синтезе и/или запасании определенных веществ. В зависимости от природы запасаемых веществ, различают три типа и несколько подтипов пластид (рисунок 1).



Рисунок 1 – Типы пластид растительной клетки

Лейкопласты. Не содержат пигментов, внутренняя мембранная система слаборазвита. Различают *амилопласты*, запасующие крахмал, *протеинопласты*, содержащие белки, *элайопласты* (или олеопласты), запасующие жиры. Этиопласты – это бесцветные пластиды тканей и органов растений, выросших при отсутствии освещения (например, клубней картофеля). При наличии света они легко превращаются в хлоропласты, пример чего мы наблюдаем при хранении клубней на свету.

Хлоропласты – пластиды в виде двояковыпуклой линзы, в которых происходит фотосинтез и синтезируется первичный крахмал. С белковым слоем мембран хлоропластов биохимически связаны растительные пигменты – хлорофилл и каротиноиды. **Хромопласты.** Пластиды жёлто-оранжевого цвета, обусловленного наличием каротиноидов (находящихся там в виде кристаллов или растворёнными в каплях жира). Образуются из хлоропластов при разрушении в них хлорофилла и внутренних мембран, хромопласты мельче хлоропластов по размерам.

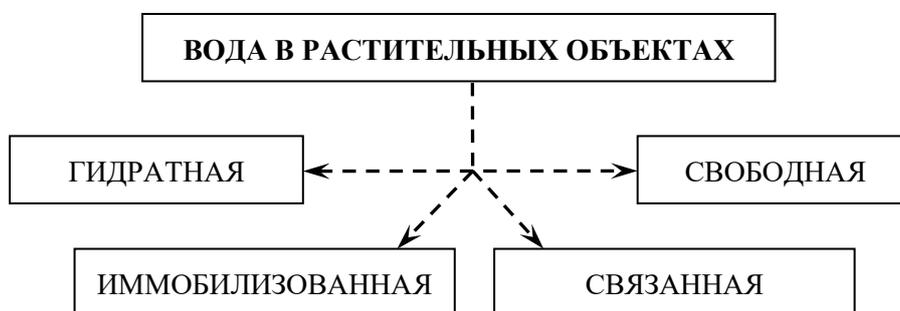
Кроме того, что синтезируемые растительной клеткой вещества накапливаются в пластидах, они могут находиться в виде характерных включений в цитоплазме клетки: крахмальные и белковые (алеироновые) зёрна, капли липидов.

Наряду с этими компонентами, в растительной клетке встречаются включения, не имеющие энергетической ценности. Это, как правило, отходы жизнедеятельности клетки; чаще других встречаются кристаллы (друзы) оксалата кальция.

Все пространство в центральной части растительной клетки занимает вакуоль, заполненная клеточным соком и окружённая тонкой мембраной – тонопластом. Вещества, содержащиеся в клеточном соке, определяют величину осмотического давления внутри клетки и тургор клеточной оболочки. От размеров вакуоли, в том числе от содержания в клетке воды в значительной степени зависит плотность и эластичность растительного сырья.

Таким образом, влага, или вода, является одним из важнейших компонентов растительной клетки. При переработке растительного сырья вода определяет многие его важнейшие технологические свойства.

Всю воду, входящую в состав растительного сырья, подразделяют с учетом вида и формы связи. **Свободная** вода составляет до 90–95 % от всей воды, присутствующей в растительной клетке. Свободная вода используется клеткой преимущественно как растворитель – дисперсионная среда и участник метаболических реакций. При хранении растительного сырья именно свободная вода интенсифицирует метаболические процессы и процессы биологической порчи. **Связанную** воду, в зависимости от форм связи с растительным материалом, подразделяют на три разновидности (рисунок 2): гидратационную, иммобилизованную и, собственно, связанную.



Формы связи воды с растительным материалом									
Характер связи	Химическая		Физико-химическая				Физико-механическая		
	Ионная	Гидратная	Моно-молекулярная	Поли-молекулярная	Осмотическая	Структурная	Микро-капилляров	Макро-капилляров	Смачивания

Рисунок 2 – Виды и формы связи воды в сырье и продуктах

На долю гидратационной воды приходится порядка 5 % от общего влагосодержания растительного материала. Такая вода имеет структуру «водород-

ных мостиковых соединений» и отличается по своим физическим свойствам от иммобилизованной и свободной воды повышенной плотностью, более низкой температурой замерзания и пониженным давлением паров. Гидратационная вода электростатически связана с диссоциированными группами боковых цепей молекул белков, и, посредством образования водородных связей, – с недиссоциированными полярными группами белковых молекул. Упрощенно говоря, гидратационная вода образует мономолекулярный слой на поверхности белков (рисунок 3).

Крупные белковые молекулы глобулинов (А) имеют относительно небольшую гидрат(ацион)ную оболочку, мелкие белковые молекулы (к которым относятся альбумины) – значительно бóльшую гидратационную оболочку (Б, рисунок 4).

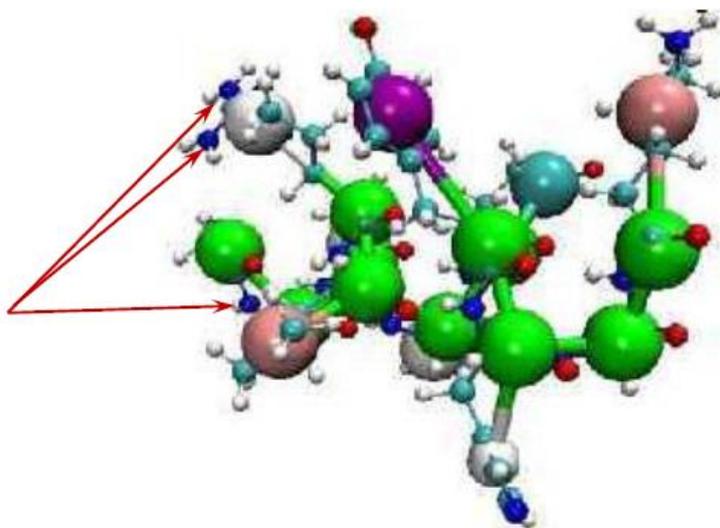


Рисунок 3 – Гидратационная оболочка белковых молекул (показано стрелкой)

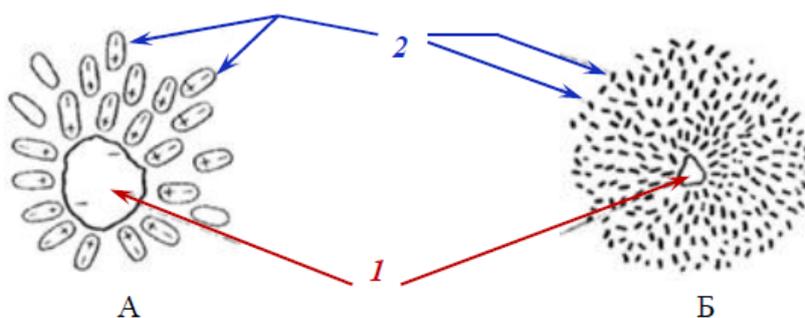


Рисунок 4 – Примеры гидратационных оболочек белковых молекул:
1 – белок, **2** – диполи воды

Иммобилизованная вода формируется в сырье в виде «льдоподобных» структур – замкнутых кластеров – между молекулами белковых веществ.

Связанная вода (5–10 % воды клетки) находится в гидрофобных каналах и полостях, существующих внутри биополимеров и мембран; входит в состав гидратных оболочек, формирующихся вокруг отрицательно и положительно заряженных ионизированных ($-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$) и полярных групп ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $=\text{C}=\text{O}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $=\text{NH}$) этих биополимеров или низкомолекулярных веществ (например, оксалата кальция $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Связанная

вода необходима клеткам и тканям растения для стабилизации и функционирования внутриклеточных макромолекул и мембранных структур, для диффузии веществ через мембрану клеток.

В свою очередь, связанную воду, *в зависимости от прочности связи с объектом*, подразделяют на связанную:

- а) осмотически (в основном вода вакуолей, резервная вода: гидратирует растворенные вещества – ионы, молекулы);
- б) коллоидно (вода органоидов клетки, до 8 % внутриклеточной воды);
- в) капиллярно (вода находится в клеточных стенках и сосудах проводящей системы).

Состоянием и формами связи влаги в структуре анализируемой системы – сырья или готового продукта – обусловлены её однородность и устойчивость к различным внешним воздействиям (перепадам температур, интенсивной механической обработке, переработке с одновременным воздействием сразу нескольких физико-химических факторов и т. д.), усвояемость.

Поскольку связанная вода определяет степень гидратации белков, от влажности сырья и соотношения в нем свободной и связанной воды зависят ценность белков в пищевом отношении, усвояемость сырья и продуктов и их способность храниться без ухудшения качества.

Кроме перечисленного, вода влияет и на технологические характеристики объектов – сыпучесть, плотность и другие. В частности, несколько более высокая плотность мучных продуктов с повышенным содержанием пищевых волокон объясняется тем, что присоединение молекул воды к этим биополимерам происходит как на поверхности целлюлозных волокон, так и внутри образованных ими капилляров; в результате чего пищевые волокна образуют уплотненную трехмерную пространственную сеть.

На хлебоприемных и зерноперерабатывающих предприятиях влажность зерна и зернопродуктов определяют на этапах приемки, отпуска и отгрузки, при производстве хлебобулочных и мучных кондитерских изделий – не реже двух раз в смену. Кроме того, определение влажности предусмотрено теххимическим контролем качества зерна и продуктов его переработки при хранении.

В производственной практике хлебопекарных, кондитерских и макаронных предприятий фактическая влажность муки нужна для расчета количества воды, необходимой для приготовления теста.

Влажность характеризует содержание в зерне, продуктах его переработки и других продовольственных объектах всей свободной и части связанной воды, выраженное в процентах по отношению к массе навески, взятой для определения влажности. Это – одна из важнейших технологических характеристик, от неё в значительной степени зависит качество вырабатываемых и хранящихся продуктов.

Свободная влага с тканями зерна, как и любого другого растительного объекта, связано слабо, поэтому при высушивании легко из него удаляется. Связанная влага физико-химически и/или механически связана с тканями зерна, поэтому удаляются при высушивании значительно хуже. При высушивании из

зерна удаляется только определенная часть связанной влаги: удаление всей связанной влаги сопряжено с более существенным воздействием на высушиваемый материал и возможно только после их разрушения.

Снижение доли влаги в плодоовощной продукции приводит к потере товарного вида, продукция становится дряблой, вялой, ухудшаются её вкусовые и технологические свойства.

Лабораторная работа №1 «Определение массовой доли влаги в продуктах переработки растительного сырья»

Цель работы: приобретение практических навыков по определению массовой доли влаги (влажности) зерна, зернопродуктов и других продуктов переработки растительного сырья.

Влажность (массовая доля влаги) введена как регламентируемый показатель качества во многие стандарты на продовольственное сырье и пищевые продукты: зерно, муку, крупы, макаронные изделия, пищевые концентраты, хлебобулочные и кондитерские изделия и другие. В научно-исследовательских работах влажность важна не только как показатель качества зернопродуктов, но необходима для расчета пищевой ценности продуктов, а также при расчёте содержания определенных компонентов «на сухое вещество».

Определение влажности зерна может проводиться прямым или косвенным методами. Сущность *прямого метода* заключается в высушивании навески размолотого зерна массой 2–2,5 г в сушильном шкафу (рисунок 5) при 130 °С в течение 40 минут, с расчетом искомого значения по убыли массы навески.



Рисунок 5 – Сушильный шкаф ES-4610

Косвенный метод определения влажности основан на использовании электровлагомера (влагомера для твердых и сыпучих веществ) и не дает абсолютно точного результата, но этот метод отличается экспрессностью. И при выполнении прямого метода анализа, и во втором случае для испытаний берут навески вместе с примесями, так как их влажность может отличаться от влажности самого зерна.

Действующие стандарты предусматривают четыре состояния (кондиции) партий зерна по влажности:

- «сухое», имеющее влажность не более 14,0 %;
- «средне-сухое» – 14,1–15,5 %;
- «влажное» – 15,6–17,0 %;
- «сырое» – с влажностью более 17,0 %.

Зерно некоторых бобовых культур считается «влажным» при влажности до 20,0 % включительно.

Влажные зерно и зернопродукты не стойки в хранении, поскольку повышенная влажность способствует протеканию биохимических процессов и стимулирует активный рост микроорганизмов. Для влажного сырья характерно и изменение его технологических свойств. В частности, у зерна снижаются натура и сыпучесть, возрастает плотность, увеличивается сопротивляемость оболочек зерна к обрушиванию, становится более мягким эндосперм.

Влажность, при которой в растительном сырье появляется свободная вода, носит название критической. Для большинства злаковых культур критическая влажность зерна находится в интервале 14,5–16 %, достигшее такой влажности зерно может заплесневеть. Зерно влажностью 16 % уже через 2,5 недели хранения при температуре 20–25 °С приобретает амбарный запах, у зерна с влажностью 18 % за это же время появляется стойкий выраженный запах плесени. Кроме того, повышенные влажность и температура зерновой массы способствуют активному развитию насекомых, что также приводит к нарушению естественного хода процессов обмена веществ в зерновой массе и порче зерна.

В связи с выше сказанным, при закупке партий зерна устанавливается базисная (для большинства культур на уровне 14 %) и ограничительная (17–19 %) норма влажности. Мука, вырабатываемая на мукомольных заводах, должна иметь влажность не более 15,0 %, различные крупы – не более 12,0...14,5 % (таблица 1).

В зависимости от анализируемого объекта и его назначения, влажность проб определяют в соответствии с методиками:

- для зерна продовольственного назначения – ГОСТ 13586.5–2015 «Зерно. Метод определения влажности»;
- для муки – по ГОСТ 9404–88 «Мука и отруби. Метод определения влажности»;
- для круп – по ГОСТ 26312.7–88 «Крупа. Метод определения влажности»;
- для макаронных изделий – по «ГОСТ 31964–2012 Изделия макаронные. Правила приемки и методы определения качества» и т. д.

Таблица 1 – Нормы влажности основных видов зернопродуктов

Культура	Объект анализа	Норма влажности, %, не более	НД
Пшеница: – мягкая	зерно		
	мука		
– твердая	крупа манная		
	макаронные изделия		
	зерно		
	мука		
	крупа пшеничная		
	макаронные изделия		
Рожь	зерно		
	мука		
	солод		
Овёс	зерно		
	толокно		
	хлопья		
Ячмень	зерно		
	крупа перловая		
	крупа ячневая		
	солод		
Гречиха	зерно		
	мука		
	ядрица		
Просо	зерно		
	пшено		
Кукуруза	зерно		
	крупа		

Сущность стандартных методик заключается в удалении влаги из предварительно измельченных объектов – зерна, муки, круп и других. Для высушивания пробы используются электрические сушильные шкафы (разные модели СЭШ), которые предварительно разогревают до необходимой температуры, и специализированная лабораторная посуда – бюксы. Процесс высушивания пробы занимает определенное время, после чего определяется уменьшение массы зерна или муки, произошедшее в результате высушивания.

Для влажного и сырого зерна применяют метод определения влажности с предварительным подсушиванием навески зерна перед измельчением.

Для продуктов, содержание влаги в которых превышает 50 %, определяют противоположную характеристику – содержание сухих веществ, в %. В качестве регламентируемого показателя качества «содержание (или массовая доля) сухих веществ, %» введено в НД на такие продукты переработки растительного сырья, как соки, нектары и напитки, соусы, пюреобразные и некоторые другие продукты.

Проведение анализа

Температура зернопродуктов, влажность которых планируется определять, должна быть приближена к температуре воздуха в лаборатории (20±5) °С.

Металлические бюксы*, используемые для определения влажности, должны храниться в эксикаторе с осушителем. Новые бюксы просушивают в сушильном шкафу в течение 60 минут, затем охлаждают и хранят до проведения анализа в эксикаторе.

СЭШ перед определением влажности разогревают до 130 °С.

Влажность определяют только в измельченных объектах. При проведении анализа зерна, круп, макаронных изделий на лабораторных весах взвешивается навеска (для зерна – 20 г), которая измельчается в лабораторной мельнице в течение 30 с (для зерна овса и ячменя продолжительность измельчения увеличивают до 60 с). Крупность размола пробы определяют просеиванием измельченного зерна в течение 3 минут на ситах № 1 и № 08, без встряхивания. В лабораторном отсеке просеивание ведется в течение 5 минут, после просеивания остаток на сите № 1 должен составлять не более 5,0 %, проход через сито № 08 – не менее 50,0 %. Если требования по крупности не выполняются (это устанавливается по результатам просеивания), то увеличивают продолжительность размалывания навески продукта.

После просеивания продукты помола распределяют тонким слоем на стекле, прикрыв другим стеклом (таким образом, чтобы слой полученной муки между двумя стеклами был толщиной 3–4 мм). Из полученного слоя муки для составления аналитической пробы специальным совочком или шпателем берут 10 точечных проб массой по 2–3 г. Далее из этой аналитической пробы берут

*Бюкс (от нем. Büchse – банка) – стеклянная или металлическая баночка с притёртой крышкой. Используется при исследованиях, связанных с высушиванием и взвешиванием сыпучих продуктов.

2–3 навески массой по 2,5–5,0 г, с разницей в массе между навесками (параллельными пробами) не более 0,1 г.

Пустые бюксы вместе с крышкой взвешивают на лабораторных весах с точностью не менее 0,01 г, записывая результаты и номера бюксов в лабораторную тетрадь. В каждый взвешенный бюкс помещают навеску продукта массой 2,5 (5,0) г и взвешивают с такой же точностью. Затем бюксы закрывают крышками до переноса в сушильный шкаф.

В разогретый до 130 °С сушильный шкаф бюксы ставят в открытом виде, на крышки в имеющиеся гнезда. При наличии незаполненных гнезд в них ставят пустые бюксы. После расстановки бюксов СЭШ закрывают. Начало высушивания проб отсчитывают с момента повторного установления в СЭШ температуры 130 °С. Продолжительность высушивания проб составляет не менее 40 минут. По окончании высушивания все бюксы вынимают из шкафа тигельными щипцами, закрывают крышками и помещают в эксикатор для охлаждения на 30–60 минут. Охлажденные бюксы быстро взвешивают и вновь ставят в эксикатор до окончания обработки результатов.

Значение влажности, в %, рассчитывают по формуле (1):

$$w = 100 \cdot \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \quad (1)$$

где m_1 – масса бюкса с навеской до высушивания, г;
 m_2 – масса бюкса с навеской после высушивания, г;
 m_0 – масса пустого бюкса, г.

Результаты исследований записывают в лабораторную тетрадь в виде таблицы 2 либо в произвольной текстовой форме.

Таблица 2 – Определение массовой доли влаги в образцах

Вариант опыта	Масса бюкса с навеской, г		Влажность, %
	до высушивания	после высушивания	
1			
2			

В производственных лабораториях в карточках анализа и в лабораторных журналах результаты записывают с точностью до второго десятичного знака, в документах о качестве результат записывают с точностью до первого десятичного знака – с такой же точностью, с какой этот показатель регламентируется в НД.

Между результатами двух параллельных определений допускается расхождение в пределах 0,2 %. При превышении допустимой разницы анализ повторяют. Все расчеты в тетради ведут с точностью до второго десятичного знака. Полученные результаты усредняют (по двум параллельным пробам) и округляют среднее арифметическое значение до первого десятичного знака.

После расчетов муку из бюксов высыпают в урну, бюксы очищают от остатков продукта обрезками фильтровальной бумаги или моют.

По результатам анализа результатов исследования в тетради записывают вывод о соответствии (несоответствии) влажности продукта требованиям действующих НД – стандартов на муку, зерно, крупы.

Для продуктов, содержание влаги в которых превышает 50 %, определяют противоположную характеристику – содержание сухих веществ, в %. В качестве регламентируемого показателя качества «содержание (или массовая доля) сухих веществ, %» введено в НД на такие продукты переработки растительного сырья, как соки, нектары и напитки, соусы, пюреобразные и некоторые другие продукты.

Контрольные вопросы:

1) В каком виде вода может входить в состав растительного сырья? Дайте определения понятий «свободная вода» и «связанная вода».

2) Чем опасно наличие в растительном сырье свободной воды? Что называют «критической влажностью»?

3) Какие формы связанной воды не удаляются при высушивании? Какая из форм связи воды с растительным материалом при высушивании может разрушаться? Почему?

4) Каково содержание воды в разных видах растительного сырья? Какие ткани и органы растений являются наиболее влагоёмкими?

5) Что такое влажность? С какой целью определяют данный показатель и для каких видов растительного сырья и продукции?

6) Какие требования НД по влажности установлены для зерна и зернопродуктов?

7) Назовите кондиции зерна по влажности. При какой влажности зерно можно направлять на хранение, при какой – на переработку, при какой обязательно предварительное подсушивание?

8) В чем заключается сущность методики определения влажности? Охарактеризуйте основные условия проведения анализа.

9) Как правильно подготовить навеску зерна или зернопродуктов для определения влажности?

10) Почему бюксы до взвешивания следует хранить в эксикаторе?

11) Назовите допустимое расхождение между результатами параллельных определений при определении влажности? В каком случае результаты определений записывают с точностью до первого и до второго десятичного знака после запятой?

12) Почему при высушивании невозможно определить всю влагу, входящую в состав зернопродуктов?

13) Какой прибор и какая посуда должны использоваться для определения влажности?

14) Назовите основные НД, в которых изложен порядок определения влажности зерна, муки, круп, макаронных и хлебобулочных изделий.

15) Существуют ли экспресс-методы определения влажности? Охарактеризуйте их.

16) Для каких видов полуфабрикатов и продуктов определяют массовую долю сухих веществ? Какими методами?

17) Какой метод определения влажности зернопродуктов считается арбитражным? Почему?

ТЕМА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

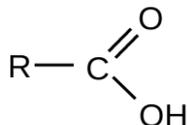
Говоря о природе кислотности продуктов и веществах, её определяющих, следует четко разграничивать, какие соединения в составе растительного сырья могут давать кислую реакцию.

В качестве кислореагирующих веществ, прежде всего, выступают кислоты: органические кислоты (включая их хорошо диссоциирующие соли), жирные кислоты и аминокислоты – принципиально разные классы органических соединений, каждый из которых выполняет в растительном сырье свои определённые функции.

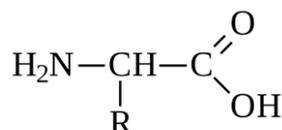
К **органическим кислотам** относят карбоновые кислоты (имеют карбоксильную группу –COOH) и сульфоновые кислоты (имеют сульфогруппу –SO₃H).

Жирными кислотами называют одноосновные алифатические карбоновые кислоты, являющиеся основными компонентами жиров и масел. Как правило, жирные кислоты содержат неразветвленную цепь, состоящую из чётного числа атомов углерода (от 4 до 24, включая карбоксильный).

Общая структурная формула органических и жирных кислот:



Аминокислоты (или аминокарбоновые кислоты) имеют в молекуле одновременно и карбоксильную группу, и аминогруппу. Принципиальная структурная формула аминокислот:



Важно отметить, что при стандартных методах определения титруемой кислотности *наибольший вклад в значение данного показателя вносят растворимые в воде соединения – органические кислоты*. Кроме перечисленных выше классов соединений, свой незначительный вклад в значение титруемой кислотности вносят белки (поскольку они также имеют определенное количество свободных кислореагирующих функциональных групп), фитиновая кислота и её соли – фитаты.

Органические кислоты являются естественным компонентом клеток всех тканей и органов растения. В запасующих органах преобладают свободные кислоты, в листьях чаще встречаются их соли. Наиболее высокое содержание органических кислот характерно для ягод и citrusовых плодов.

Самыми распространенными кислотами растительного сырья являются уксусная кислота (участник обмена веществ клетки – ацетил-КоА); яблочная, лимонная, щавелевая и янтарная кислоты, принимающие участие в метаболиз-

ме растительной клетки в качестве первичных продуктов фотосинтеза у участниц цикла Кребса.

Яблочная кислота ($\text{COOH-CH}_2\text{-CH(OH)-COOH}$), встречающаяся в растительном материале в виде l-изомера, при фотосинтезе подвергается изменениям, выступая в качестве промежуточного продукта в биосинтезе других соединений. *Щавелевая кислота* (COOH-COOH) – один из побочных продуктов метаболизма, она накапливается в растительных клетках в основном в виде *оксалатов* – кристаллов специфичной для каждого растения формы; этот признак используется при идентификации сырья.

Значительно реже встречаются *янтарная* ($\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), *винная* ($\text{COOH-CH(OH)-CH(OH)-COOH}$, D-изомер), *фумаровая* (COOH-CH=CH-COOH), по циклу Кребса связанная с янтарной и яблочной кислотами, *сорбиновая* ($\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$), связанная со сладким спиртом сорбитом, *dl-молочная* ($\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$) и *глиоксалева* (COH-COOH) кислоты.

Особо необходимо сказать о кетокислотах, обладающих высокой физиологической активностью и также выступающих участниками цикла Кребса: *пировиноградной* ($\text{CH}_3\text{-CO-OOH}$), *α-кетоглутаровой* ($\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-COOH}$), *щавелево-уксусной* ($\text{COOH-CH}_2\text{-CO-COOH}$) и *щавелево-янтарной* ($\text{COOH-CH}_2\text{-CH(COOH)-CO-COOH}$). Кислоты ряда циклогексана – *хинная* и *шикимовая* – играют особо важную роль в биосинтезе ароматических аминокислот (шикимовая – предшественник фенилаланина и тирозина) и некоторых других веществ.

Летучие органические кислоты – муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, валериановая и их эфиры – влияют не только на кислотность и вкус растительного сырья, но и на его аромат, придавая характерный «острый» или пряный запах. Сложные эфиры органических кислот определяют характерный аромат растительного сырья: октилацетат – апельсина, изоамиловый эфир изо-валериановой кислоты – яблок и т. д.

Органические кислоты влияют на формирование специфических аромата и вкуса растительного сырья. Каждая кислота имеет свой специфический вкус и порог ощущения: у яблочной и лимонной кислот вкус чистый, невяжущий; для винной кислоты характерен кислый вяжущий вкус; у янтарной кислоты вкус неприятный и т.д. Интенсивность кислого вкуса сырья определяется составом и соотношением индивидуальных кислот, составом основных и сопутствующих компонентов: сахара маскируют кислый вкус, дубильные вещества усиливают и делают вяжущим.

Соотношение органических кислот с простыми углеводами положено в основу расчётной оценки интенсивности вкуса растительного сырья – сахарокислотный коэффициент (2).

$$K_{СК} = \frac{C_{\text{глюкозы}} \cdot 100 + C_{\text{фруктозы}} \cdot 200 + C_{\text{сахарозы}} \cdot 145}{C_{\text{кислоты}}} \quad (2)$$

где C – содержание этих веществ, %.

С позиций биохимии питания органические кислоты снижают рН среды кишечника, благодаря чему способствуют формированию благоприятного состава микрофлоры и тормозят процессы гниения. Фенолокислоты обладают также бактерицидным действием.

Кроме того, что органические кислоты являются одним из обязательных естественных компонентов растительного сырья, их присутствие в продовольственном сырье и готовой продукции может также свидетельствовать о биохимических превращениях углеводов, продуктом сбраживания которых органические кислоты часто выступают. Примеры таких превращений приведены в таблице 3; субстратом в них, как правило, выступает глюкоза.

Таблица 3 – Образование продуктов брожения

Тип брожения	Протекающая реакция	Кислота
Молочнокислое	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$	Молочная
Пропионовокислое	$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O$	Пропионовая
Маслянокислое	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	Масляная

При количественном определении кислотности используют следующие понятия.

Общая кислотность – концентрация всех присутствующих в пробе продукта катионов H^+ (свободных и связанных). Общая кислотность соответствует сумме молярных концентраций эквивалентов всех присутствующих в пробе продукта сильных и слабых кислот. Общую кислотность определяют путём нейтрализации кислот, присутствующих в пробе продукта или приготовленном из неё растворе, постепенным добавлением раствора щелочи установленной концентрации (как правило, 0,1М растворами NaOH или KOH). Титрование проб осуществляют с добавлением в их состав индикатора фенолфталеина либо методом потенциометрического титрования.

Активная кислотность – концентрация свободных катионов H^+ , имеющих в пробе продукта или приготовленном из неё растворе при данных условиях. Выражается значением рН раствора.

Потенциальная кислотность – концентрация всех присутствующих в пробе продукта или приготовленном из неё растворе катионов H^+ , связанных в виде молекул или ионов слабых кислот. Представляет собой разность между общей и активной кислотностями раствора.

Для зерна и зернопродуктов величина кислотности позволяет судить о свежести этих объектов. Зерно и продукты его переработки содержат достаточно много веществ, имеющих кислый характер, и с увеличением продолжительности их хранения значение кислотности возрастает.

Рассматриваемый показатель очень важен и в характеристике семян масличных культур и продуктов их переработки и введен в соответствующие стандарты на эти культуры как «кислотное число жира».

Кислотность муки и круп определяют при наблюдении за качеством при их хранении: если значение показателя нарастает, то это является свидетельством протекания процессов, ухудшающих качество зернопродуктов. Кислотность муки является важным показателем качества для работников хлебопекарной промышленности, поскольку от неё зависит кислотность теста и готового хлеба. Особенно важное значение это имеет при производстве хлеба из ржаной муки.

Кислотность зернопродуктов можно определять несколькими способами, но стандартным является только метод прямого титрования «по болтушке». Кислотность муки и отрубей определяют в соответствии с ГОСТ 27493–87 «Мука и отруби. Метод определения кислотности по болтушке», кислотность зерна определяется в соответствии с ГОСТ 10844–74 «Зерно. Метод определения кислотности по болтушке».

Для зерна и муки данный показатель не является регламентированным, однако он имеет существенное значение в их технологической характеристике в качестве сырья. Кислотность свежеработанной пшеничной муки по болтушке не превышает 2,5–3 град, ржаной – 4–4,5 град.

Для продуктов переработки плодоовощного сырья подобная методика положена в основу ГОСТ ISO 750–2013 «Продукты переработки фруктов и овощей. Определение титруемой кислотности».

Кислотность соков, нектаров и напитков на фруктово-ягодной основе часто контролируют определением значения pH (не более 4–4,5 ед. pH), соответствие значения которого свидетельствует о ферментативной и микробиологической стабильности продукции. Для других продуктов переработки плодоовощного сырья (вина, шоре, соусы, пасты и т. д.) кислотность чаще всего определяют аналогично кислотности по болтушке и выражают в процентах, в пересчёте на преобладающую органическую кислоту. Для этого полученные результаты умножают на соответствующий коэффициент, предусмотренный ГОСТ ISO 750–2013 (таблица 4).

Таблица 4 – Коэффициенты пересчета кислотности

Наименование кислоты	Коэффициент
Молочная кислота	0,090
Яблочная кислота	0,067
Лимонная кислота	0,064
Уксусная кислота	0,060
Щавелевая кислота	0,045
Винная кислота	0,075

Лабораторная работа №2 «Определение кислотности продуктов переработки растительного сырья»

Цель работы: приобретение практических навыков по определению титруемой кислотности зерна, зернопродуктов и других продуктов переработки растительного сырья.

В технологической практике *кислотность продукта выражается количеством раствора гидроокиси натрия* (в см³), *необходимого для нейтрализации кислот в 100 г продукта.*

Кислотность выражается в градусах кислотности (град). *Градус кислотности – это количество 0,1 М или 0,1 н щелочи (в мл), необходимое для нейтрализации всех кислореагирующих веществ в 100 г или 100 мл исследуемого сырья или продукта.*

Метод определения кислотности достаточно прост в выполнении, но иногда возникают трудности при определении конца титрования, так как бывает сложно уловить момент появления у титруемой пробы бледно-розовой окраски, обусловленной изменением цвета фенолфталеина в слабощелочной среде. Поэтому, в частности, для вин и других интенсивно окрашенных продуктов из плодоовощного сырья ГОСТ ISO 750–2013 рекомендует применять не индикаторный метод, а метод потенциометрического титрования.

Определение кислотности суспензии зернопродуктов (кислотности муки «по болтушке»)

Для анализа берут навеску муки или зерна массой 50 г. Зерно предварительно очищают от сорной примеси, отбрасывая испорченные зерна, и размалывают на лабораторной мельнице. Крупность размола должна быть такой, чтобы все измельченное зерно при просеивании проходило через сито № 08.

Анализ кислотности по болтушке выполняют в двух повторностях.

На лабораторных весах берут навеску размолотого зерна или муки массой 5,0±0,1 г, высыпают навеску муки в чистую сухую коническую колбу вместимостью 250–300 см³ и вливают в эту же колбу 50–100 см³ дистиллированной воды. Содержимое колбы перемешивают, далее в колбу добавляют 5–7 капель 1% раствора фенолфталеина и снова перемешивают.

Содержимое колб титруют из бюретки 0,1 н раствором гидроокиси натрия или гидроокиси калия. Титрование ведут медленно, хорошо перемешивая содержимое колбы после добавления каждой капли раствора щелочи. Окончание титрования фиксируют при появлении бледно-розовой окраски болтушки, сохраняющейся в течение 30 с. при спокойном стоянии колбы.

Если исходная болтушка интенсивно окрашена и трудно уловить момент появления розового оттенка, рядом с установкой для титрования ставят вторую колбу с пробой-болтушкой, для постоянного сопоставления оттенка в титруемой пробе с первоначальным цветом пробы.

При определении кислотности по болтушке в реакцию с ионами щелочи вступают все кислореагирующие вещества, как растворимые, так и нерастворимые в воде. Кроме реакции нейтрализации, щелочь частично адсорбируется на гранулах крахмала, поэтому численное значение кислотности зернопродуктов, установленное этим методом, как правило, – самое высокое.

Кислотность продукта X , в град, рассчитывают по формуле (3).

$$X = \frac{V \cdot 100}{m \cdot 10} = V \cdot 2 \quad (3)$$

где V – объем 0,1 н раствора щелочи, пошедший на титрование, см³;

m – масса навески продукта, г;

1/10 – коэффициент пересчета 0,1 н раствора гидроокиси натрия на 1М.

Вычисление ведут до второго десятичного знака с последующим округлением до первого десятичного знака. Допустимое расхождение между параллельными определениями – не более 0,2 град – для муки, зерна и не более 0,1 град – для отрубей.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных, если не превышено допустимое расхождение между результатами. В противном случае определение кислотности необходимо продублировать в 3-й раз.

Определение кислотности зернопродуктов по водной вытяжке

На лабораторных весах берут навеску измельченного зерна или муки 10,0 г, переносят в сухую коническую колбу вместимостью 250–300 см³, приливают к ней 100 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют колбу при комнатной температуре на два часа.

В процессе выдерживания содержимое колбы периодически перемешивают; в течение этого времени происходит извлечение из навески только водорастворимых соединений, имеющих кислые свойства.

По истечении 2-х часов выдерживания содержимое колбы вновь перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр в чистую коническую колбу (первые мутные порции фильтрата возвращают на фильтр).

Из полученного фильтрата мерной пипеткой отбирают 25 см³ в две конические колбы, вносят в каждую колбу по 5–7 капель раствора фенолфталеина и перемешивают. Содержимое каждой колбы титруют 0,1 н раствором щелочи до появления в пробе бледно-розового окрашивания.

Значение кислотности X , в град, рассчитывают по формуле (4).

$$X = \frac{V_1 \cdot K \cdot V_B \cdot 10}{V_2 \cdot m} \quad (4)$$

где V – объем 0,1 н раствора щелочи, пошедший на титрование, см³;

K – коэффициент поправки к титру щелочи, $K = C_{\text{факт}} : 0,1$ (н), при этом $C_{\text{факт}}$ – фактическая концентрация раствора гидроокиси натрия;

V_B – объем воды (или спирта), взятый для приготовления водной (спиртовой) суспензии, см³;

V_2 – объем фильтрата (аликвотный объем), взятого на титрование в одну колбу, см³;

m – масса навески продукта, г.

Нерастворимые в воде кислореагирующие вещества при фильтровании останутся на фильтре, оттитровываться будут только водорастворимые вещества. Поэтому кислотность, определенная по водной вытяжке, как правило, имеет численное значение в 1,5–2 раза меньше, чем кислотность, определенная по болтушке.

Определение кислотности зернопродуктов по водноспиртовой вытяжке

На лабораторных весах берут навеску размолотого зерна или муки массой 2,5 г, переносят в сухую коническую колбу вместимостью 250–300 см³ и приливают в колбу 25 см³ 67 % раствора этилового спирта.

Содержимое колбы интенсивно перемешивают в течение 5 минут и фильтруют через складчатый фильтр в чистую колбу.

Пипеткой отбирают 10 см³ фильтрата, переносят его в новую колбу и добавляют три капли спиртового раствора фенолфталеина. Полученную пробу – содержимое колбы – титруют раствором гидроокиси натрия концентрацией 0,1 н до появления бледно-розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

Кислотность X , в град, рассчитывают по формуле (5).

При определении кислотности этим методом в реакцию вступают все кислореагирующие вещества, растворимые в воде и спирте, но нет адсорбции щелочи на крахмальных гранулах, поэтому значение кислотности по этому методу должно получаться несколько ниже по сравнению со значением, определенным по болтушке.

Определение активной кислотности зернопродуктов. Активная, или истинная, кислотность (рН), от которой зависят набухание, растяжимость и другие свойства белковых веществ муки, определяется потенциометрически.

Для получения вытяжки в стеклянный химический стакан ёмкостью 250 мл берут навеску муки массой 10 г с погрешностью не более 0,01 г, добавляют 100 мл горячей дистиллированной воды и нагревают до кипения для инактивации ферментов. Полученную смесь настаивают в течение одного часа, перемешивают и измеряют активную кислотность на приборе рН-метре.

В зависимости от товарного сорта муки, активная кислотность (рН) составляет 5,9–6,2. Этот показатель не регламентируется стандартами, но играет важную роль в технологии производства хлеба: от активной кислотности зависит скорость брожения и других протекающих в тесте биохимических процессов.

Определение кислотности продуктов переработки плодов и овощей осуществляют в соответствии с методиками ГОСТ ISO 750–2013.

При анализе жидких продуктов часть предварительно перемешанной лабораторной пробы фильтруют через вату, бумажный фильтр или ткань. В мерную колбу вносят 25 г фильтрата или лабораторной пробы, взвешенной с точностью до 0,01 г.

Из пробы газированных жидких продуктов перед анализом удаляют углекислый газ встряхиванием пробы в течение 3–4 минуты при пониженном давлении. Другие продукты перед отбором аналитической пробы гомогенизируют (замороженные продукты предварительно размораживают, сушеные – измельчают).

Доводят водой до метки, тщательно перемешивают, добавляют индикатор – раствор фенолфталеина – и титруют из бюретки раствором гидроокиси натрия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30 с.

Общую кислотность (X , %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot K_1 \cdot V_0 \cdot 100}{m \cdot V_1} \quad (5)$$

где V – объём 0,1 М раствора щелочи, израсходованный на титрование фильтрата, см³;

K – коэффициент пересчёта на точно 0,1 М раствор щелочи;

K_1 – коэффициент пересчёта кислотности продукта на соответствующую органическую кислоту, г/см³;

V_0 – общий объём, до которого доведена проба навески, см³;

m – масса навески продукта, г;

V_1 – объём фильтрата (аликвотный объём), взятого на титрование в одну колбу, см³.

В заключение лабораторной работы необходимо провести анализ результатов, полученных при выполнении каждой методики, сделать вывод о правильности определения кислотности и сравнить значения кислотности с данными учебно-справочной литературы и НД.

Контрольные вопросы:

1) Какие вещества в продуктах переработки растительного сырья имеют кислый характер? Какие из них вносят основной вклад в значение кислотности?

2) Какие понятия используют при количественном определении кислотности? В чем особенность активной кислотности?

3) О чем можно судить по величине кислотности?

4) Как меняется кислотность при хранении продуктов? Положительным или отрицательным признаком является увеличение кислотности продукта при его хранении?

5) Дайте определение понятия «градус кислотности».

6) Перечислите методы определения кислотности. Каким методом определения кислотности пользуются в производственных лабораториях?

7) Почему при определении кислотности по болтушке получается наибольшее ее численное значение?

8) Объясните, почему результаты определения кислотности по водно-спиртовой вытяжке должны отличаться от результатов титрования по болтушке?

9) Какое значение кислотности по болтушке характерно для свежесвыработанной пшеничной и ржаной муки?

10) Как рассчитывают значение кислотности по болтушке и водно-спиртовой вытяжке?

11) Что такое «сахарокислотный коэффициент»? Когда он применяется?

12) Каким образом значение кислотности можно перевести в содержание органических кислот?

13) Для каких продуктов переработки растительного сырья контролируют значение рН и с какой целью?

- 14) В каком случае для определения кислотности целесообразно применять метод потенциометрического титрования?
- 15) С какой целью определяют значение активной кислотности муки?
- 16) Приведите примеры продуктов и методик определения: а) общей кислотности, б) активной кислотности.
- 17) Назовите пределы значений кислотности по болтушке для доброкачественной пшеничной и ржаной муки.
- 18) Как взаимосвязаны сорт муки и значение её кислотности по болтушке?

ТЕМА 3. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

Белок – биополимер, состоящий из остатков аминокислот, соединенных между собой ковалентными (пептидной и дисульфидной) и нековалентными (водородная, ионная, гидрофобная) связями.

В соответствие с выполняемыми функциями, все вещества белковой природы подразделяют на 12 классов:

- 1) ферменты;
- 2) запасные белки, *характерные только для растений*;
- 3) белки-ингибиторы ферментов;
- 4) транспортные белки: транслоказы, цитохромы и др.;
- 5) регуляторы активности генома – репрессорные белки (регулируют биосинтез блокирующей части ДНК) и др.;
- 6) белки-гормоны (но существуют также и стероидные гормоны);
- 7) защитные белки (антитела, растительные яды и др.);
- 8) структурные – мембранные белки;
- 9) сократительные белки (микротрубочки, турбулин);
- 10) рецепторные белки;
- 11) белки оболочки вирусов;
- 12) белки с иными функциями (например, монелин – сладкий пептид африканского растения *Dioscoreophyllum cumminsii*).

По сравнению с сырьем животного происхождения, растительное сырье значительно менее богато белками (таблица 5). Исключение из приведенного ряда данных по содержанию белка в органах и тканях растений составляют орехи, содержание белка в ядре которых может превышать 20 %.

В свою очередь, на входящие в состав белков аминокислоты также распространяется несколько типов классификаций:

- по R-группам (неполярные и полярные; полярные – незаряженные, заряженные при $pH=7$ отрицательно и заряженные при $pH=7$ положительно);
- по функциональным группам (алифатические; ароматические; гетероциклические);
- по проявляемым кислотно-основным свойствам (с преобладанием кислотных свойств; с преобладанием основных свойств);
- по значению в питании – незаменимые и заменимые.

Таблица 5 – Содержание белка в различных органах растений

Органы растений	Содержание белков, % от массы свежей ткани
Семена	10–13
Стебли	1,5–3,0
Листья	1,2–3,0
Корни	0,5–3,0
Фрукты	0,3–1,0

Незаменимые аминокислоты не могут синтезироваться в организме человека и должны поступать с ежедневным рационом – это: лизин, метионин, триптофан, лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин и треонин. В детском питании к незаменимым относят также аргинин и гистидин.

Заменимые аминокислоты (остальные) могут синтезироваться в организме, поэтому при оценке полноценности белков и проектировании новых продуктов их не принимают во внимание.

Важнейшим отличием растительных белков от белков животного происхождения является наличие в плодах многих относительно богатых белками видов растений двух специфических фракций белковых веществ – проламинов и глютелинов.

В целом же, с учётом растворимости, простые белки зерна подразделяют на пять фракций:

- водорастворимую (альбумины),
- солерастворимую (глобулины),
- щелочерастворимую (глютелины),
- спирторастворимую (проламины),
- нерастворимый белковый остаток.

Наиболее высокой биологической усвояемостью обладают водо- и солерастворимая фракции, отличающиеся не только растворимостью, но и молекулярной массой: альбумины имеют молекулярную массу порядка 69 000 Да, глобулины – 150 000 Да. Однако в зерне важнейших злаков хлебопекарного значения основная часть белков культур представлена проламинами (глиадин пшеницы и ржи, гордеин ячменя, авенин овса и т.д.) и глютелинами (глютенин пшеницы и др.), важными с технологических позиций. В частности, глиадин и глютен пшеницы при набухании образуют губчатую и вязкую коллоидную систему – *клейковину*, содержание которой определяет качество и пищевую ценность хлебобулочных, макаронных и мучных кондитерских изделий. Соотношение в отмытой клейковине глиадина и глютенина составляет примерно 2:3.

Белки ржаной муки, напротив, набухают неограниченно, пептизируют и дают вязкую, но малоэластичную и крошащуюся клейковину.

Тритикале – гибрид пшеницы и ржи, подобно пшенице, содержит клейковинные белки, однако на качестве клейковины отрицательно отражается геном ржи: при отмывании клейковина «расползается» и более слабая по качеству, чем пшеничная.

Белки ячменной муки образуют связную, но менее эластичную массу, чем белки пшеницы.

Белковые вещества кукурузной, гречневой и овсяной муки набухают слабо, без образования клейковины и связного теста.

Определение клейковины представляет собой частный случай количественного анализа определенных фракций белков растительного сырья, нашедший широкое применение в технологической практике.

Количество и качество сырой клейковины является одним из наиболее информативных свойств при определении направлений целевого использования зерна пшеницы. При этом *качество клейковины* характеризуется совокупностью её физических свойств: растяжимостью, упругостью и эластичностью. Для зерна пшеницы подтверждена прямая корреляция между натурой и выходом муки, массовой долей белка и клейковины, качества хлеба – с содержанием белка, содержанием и качеством клейковины.

Для зерна пшеницы подтверждена прямая корреляция между натурой и выходом муки, массовой долей белка и клейковины, качества хлеба – с содержанием белка, содержанием и качеством клейковины (таблица 6).

Таблица 6 – Взаимосвязь биохимических и технологических свойств муки

Белок, %	Клейковина		Число падения, с	Сила муки, е.а.	Качество по фаринографу	Объём хлеба, см ³	Общая хлебопекарная оценка, балл
	%	ед. ИДК					
14,5	32,1	63	297	330	176	550	4,4
14,8	27,0	70	209	209	120	500	3,8
15,2	24,1	60	245	215	114	410	3,0
15,6	22,6	65	209	145	108	320	2,0
14,9	22,5	65	207	250	108	360	2,2

Качество и количество сырой клейковины относятся к основным регламентируемым показателям качества зерна пшеницы и пшеничной муки. Для подробной характеристики технологических свойств зерна пшеницы и полученной из него муки принята многоуровневая градация качества клейковины. Требования к качеству клейковины по ГОСТ 27839–2013 «Мука пшеничная. Методы определения количества и качества клейковины» приведены в таблице 7.

При образовании клейковинного скелета теста возникают поперечные связи между смежными цепями белков. Эти связи упрочняют структуру теста и снижают его липкость.

Клейковина, отмытая от крахмала и частиц оболочек, представляет собой упругий, связный, сильно гидратированный студень, содержащий до 65 % воды – это «сырая клейковина». При высушивании сырой клейковины в сушильном шкафу до постоянной массы получают «сухую клейковину», которую используют в пищевой промышленности как технологический улучшитель или белковый обогатитель.

Таблица 7 – Классификация уровней качества клейковины пшеничной муки

Группа качества	Характеристика клейковины	Качество клейковины, ед. ИДК для муки			
		хлебопекарной, сорта		макаронной, из пшеницы	
		экстра, крупчатка, в/с, 1/с, обойная	2/с	мягкой экстра, в/с, 1/с	твердой в/с, 1/с, 2/с
	Крошащаяся	Не определяют			
III	Неудовлетворительная крепкая	не более 32 37		–	–
II	Удовлетворительная крепкая	33–52	38–52	–	–
I	Хорошая	53–77		48–77	48–82
II	Удовлетворительная слабая	78–102		78–102	83–107
III	Неудовлетворительная слабая	103 и более		103 и более	108 и более
	Не отмывающаяся	Не определяют			

На изменении биохимических свойств клейковины основано применение некоторых хлебопекарных улучшителей окислительного и восстановительного действия. Эффект таких технологических добавок основан на изменении соотношения в обработанной муке сульфгидрильных (–SH–) групп и дисульфидных (–S–S–) связей.

Улучшители окислительного действия (аскорбиновая кислота, E300; бромат калия, E924a, в дозировке 2–5 г на 100 кг муки; некоторые ферментные препараты, например, глюкозооксидаза – посредством образования пероксида водорода в результате окисления β-D-глюкозы) применяют в основном те мукомольные предприятия, которые отвечают за обеспечение дозревания муки перед реализацией.

Окисление сульфгидрильных (–SH–) групп в белках клейковины приводит к возникновению между ними поперечных «мостиков» дисульфидных (–S–S–) связей (рисунок 6), с увеличением количества которых укрепляется клейковина, возрастает водопоглотительная способность муки, улучшается стабильность теста при брожении, увеличивается объём выпекаемого хлеба. При этом новые дисульфидные связи могут образовываться как внутримолекулярными, так и межмолекулярными, соединяющими две отдельные полипептидные цепи (рисунок 7).

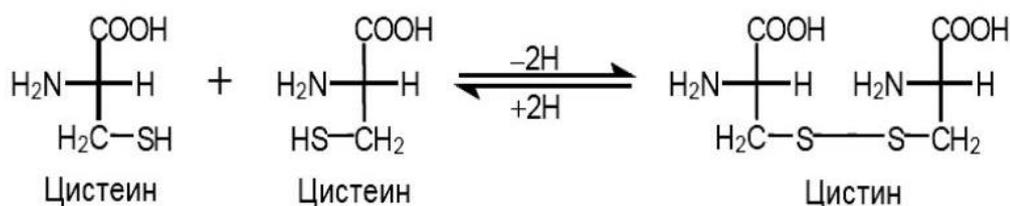
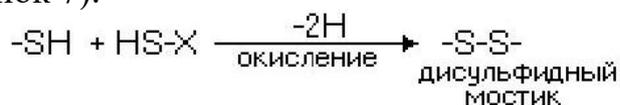


Рисунок 6 – Образование дисульфидных связей

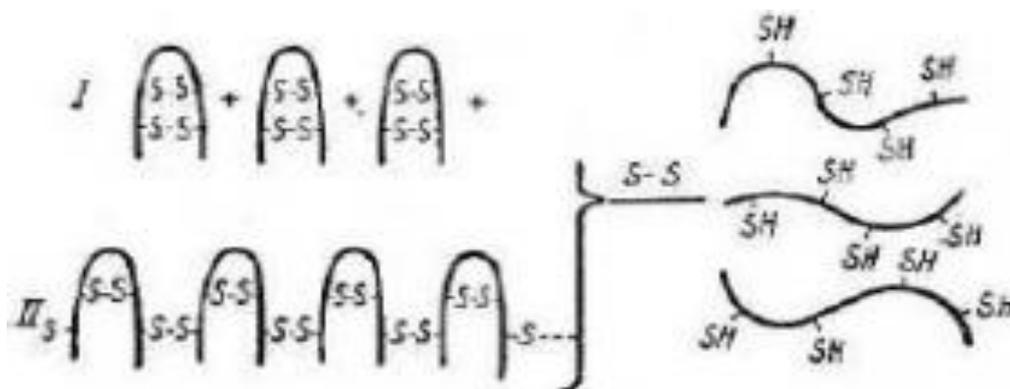


Рисунок 7 – Восстановление дисульфидных связей в глиадине (I) и глютенине (II)

Улучшители восстановительного действия (гипосульфит натрия в дозировке 0,001–0,002 % к массе муки; глутатион; L-цистеин; экстракты и автолизаты дрожжей) необходимы при использовании муки с чрезмерно крепкой и короткорвущейся клейковиной. Такие улучшители ослабляют клейковину, повышают её пластичность и способствуют сглаживанию трещин и надрывов, характерных для изделий из муки с короткорвущейся клейковиной. Это необходимо, например, при производстве слоеных и некоторых мучных кондитерских изделий.

Лабораторная работа №3 «Качественный и количественный анализ аминокислот и белков»

Цель работы: закрепление теоретических знаний по теме «Белки», приобретение практических навыков по выявлению белков в составе продуктов переработки растительного сырья и определению количества и качества клейковины.

Выделение белка. Растворимость белков тесно связана с тем, в какой среде они находятся. В дистиллированной воде белки растворяются плохо, но с увеличением ионной силы раствора их растворимость возрастает. Чаще всего из растительного и животного сырья белки выделяют экстракцией (определёнными растворителями, в соответствии с растворимостью фракций белков) и высаливанием (рисунок 8) – осаждением белков из раствора в присутствии нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , MgCl_2 и других). Белок выпадает в осадок, не подвергаясь денатурации.

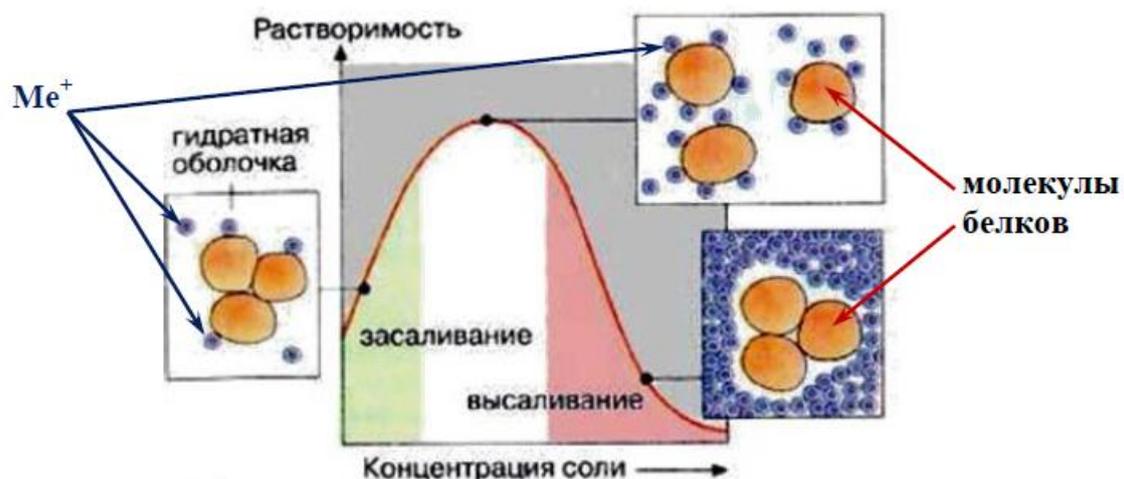


Рисунок 8 – Высаливание белков из раствора

Механизм взаимодействия белковых веществ с солями щелочных и щелочноземельных металлов основан на адсорбции ионов металлов на отрицательно заряженных группах частиц белка. Это переводит белковые молекулы в электро-нейтральное состояние, снижая их растворимость (стадия «засаливание»). Диссоциируя, соли металлов связывают много воды, что при достаточно высоких концентрациях солей в растворе вызывает дегидратацию частиц белка – лишает их гидратной оболочки. Как следствие, из коллоидного состояния белок переходит в более «сухое» – кристаллическое, и выпадает в осадок (стадия «высаливание»).

Для осаждения разных фракций белков используют растворы соли разной концентрации. Глобулины, например, осаждаются полунасыщенным раствором сернокислого аммония, альбумины – только насыщенным раствором. Объясняется это тем, что молекулы глобулинов – крупнее молекул альбуминов. Данная зависимость растворимости белков от концентрации соли в растворе используется для разделения альбуминов и глобулинов.

Получение раствора животных белков. В пробирку наливают 2–3 см³ раствора яичного белка и равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют на 10 минут. Выпадает хлопьевидный осадок глобулинов. Осадку дают отстояться, после чего фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

К фильтрату добавляют кристаллический сульфат аммония до насыщения. Выпадает хлопьевидный осадок альбуминов. Осадок снова отфильтровывают. С фильтратом проводят биуретовую реакцию: по отрицательной реакции делают заключение об отсутствии белков в фильтрате (полноте осаждения).

Получение раствора растительных белков. 25 г пшеничной или масличной (подсолнечной; соевой; амарантовой; ореховой; кунжутной) муки смешивают со 100 см³ воды, в котором растворен 1 г поваренной соли, и оставляют эту смесь на 30–40 минут, с интенсивным периодическим встряхиванием. Далее подсоленную суспензию переносят в воронку на складчатый фильтр; первые 1–

2 см³ фильтрата возвращают на фильтр. Полученный фильтрат представляет собой раствор простых углеводов, альбуминов и глобулинов.

Проведение качественных реакций. Присутствие в пробе белка или некоторых аминокислот можно выявить проведением качественных реакций. Образование окрашенных веществ при взаимодействии белка с некоторыми реактивами объясняется наличием в молекуле белка определенной аминокислоты, функциональной группы или химической связи.

Применяемые в лабораторном анализе качественные реакции можно подразделить на два типа:

- универсальные – биуретовая (позволяет выявить наличие любых белков) и реакция с нингидрином (в эту реакцию вступают не только белки, но и все α-аминокислоты);

- специфичные, в результате которых в растворе пробы образуются характерные окрашенные продукты реакции (при условии наличия в анализируемой пробе определенных аминокислот либо определенных функциональных групп: реакция Фоля – на серосодержащие аминокислоты, реакция Миллона – на тирозин, реакция Сакагучи – на аргинин и т. д.).

Объекты исследований: раствор белков из муки пшеницы или масличных семян; молоко или растительная белоксодержащая эмульсия; раствор куриного яйца.

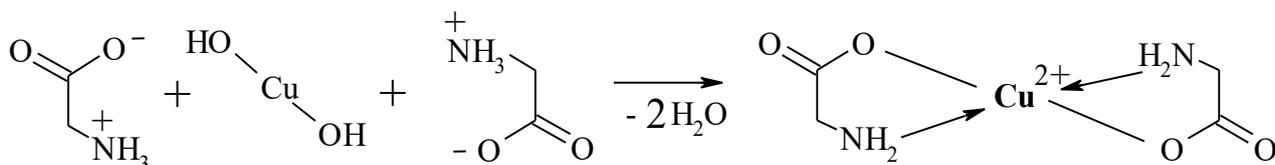
1) Биуретовая реакция основана на реакции между пептидной связью белков и диссоциирующими солями меди.

В щелочной среде пептидные связи образуют с ионами Cu²⁺ комплексное соединение фиолетового цвета (имеющее красный или синий оттенок, в зависимости от числа пептидных связей в белке). По интенсивности окрашивания раствора можно условно оценить количество пептидных связей, а, следовательно, – и содержание белка в анализируемой пробе.

Реактивы: 10 % раствор NaOH; 0,5 % раствор CuSO₄.

В пробирку пипеткой наливают 2 см³ анализируемого раствора и столько же 10 % раствора едкого натрия, осторожно смешивают, затем в пробирку вносят 3–4 капли раствора сернокислой меди.

При наличии в пробе белков смешивание реактивов в пробирке в указанной последовательности вызывает фиолетовое окрашивание. Необходимо избегать избытка ионов Cu²⁺, так как при этом фиолетовое окрашивание перекрывается более интенсивным синим.



При низком содержании белка и недостаточной четкости окрашивания аналитической пробы опыт повторяют. В чистой пробирке снова смешивают

растворы белка и щелочи, затем наклоняют пробирку и по стенке приливают в неё из пипетки 0,5–1 см³ раствора сульфата меди – таким образом, чтобы получить в пробирке верхний слой сульфата меди, не смешанный с остальной жидкостью. В этом случае на границе слоев появляется отчетливое прозрачно-фиолетовое кольцо.

2) Результат *реакции с нингидрином* зависит от реакции среды: в кислой среде (рН < 5,0) аминокислоты в реакции с нингидрином образуют соответствующий альдегид, аммиак, углекислый газ и воду.

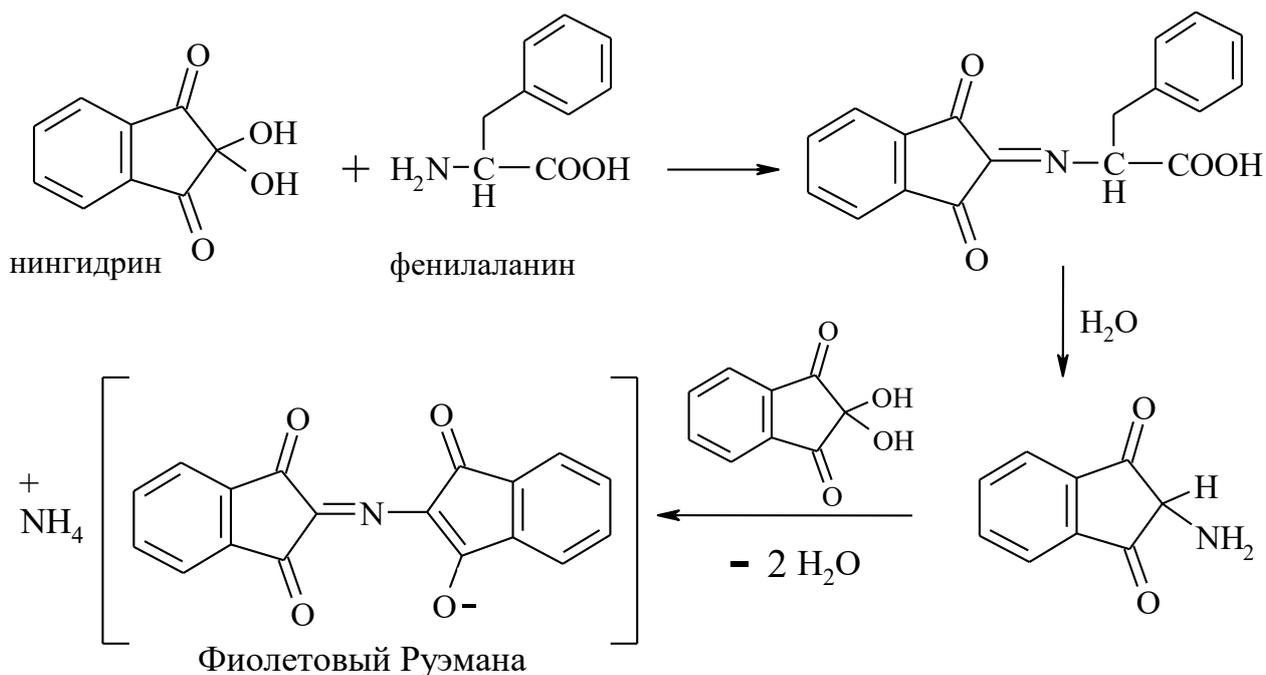
В слабокислой среде (рН > 5,0) аминокислоты и белки в реакции с нингидрином образуют соединения синего цвета, углекислый газ и воду.

Реактивы: 0,1 % раствор нингидрина.

Реакция с нингидрином характерна только для α-аминокислот и применяется в целях идентификации и определения количественного содержания аминокислот расчетом через количество выделившегося в результате реакции углекислого газа.

Окрашенный комплекс синтезируется из двух молекул нингидрина, соединенных друг с другом через азот α-аминогруппы аминокислот. При нагревании α-аминокислот (и состоящих из них белков) в присутствии нингидрина протекает окислительное дезаминирование α-аминогрупп, при этом молекула нингидрина восстанавливается. Далее восстановленная молекула нингидрина реагирует с аммиаком и окисленными формами нингидрина. Образуется сине-фиолетовый комплекс Руэмана.

В пробирку вносят 2 см³ раствора белка, добавляют 0,5 см³ 0,1 % раствора нингидрина и медленно нагревают. Смесь окрашивается в фиолетовый или фиолетово-розоватый цвет, после выдерживания прогретой пробирки в штативе её содержимое синеет.



3) *Ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера)* характерна для циклических аминокислот, содержащих бензольное кольцо (фенилаланин, ти-

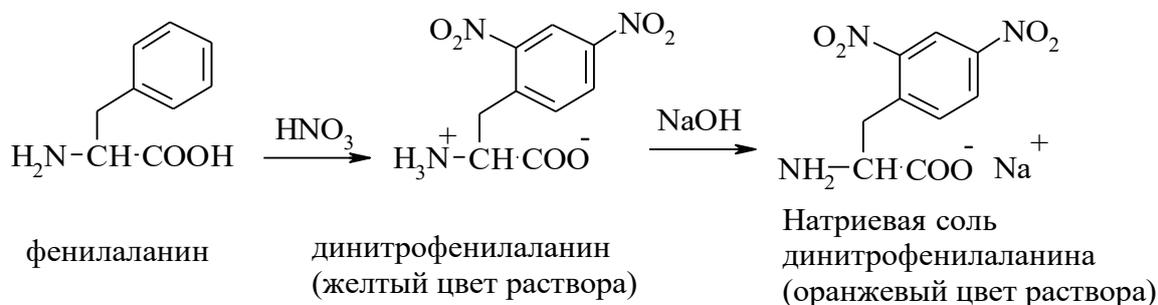
розин и триптофан), такие аминокислоты образуют с концентрированной азотной кислотой динитропроизводные соединения желтого цвета.

Реактивы: концентрированная HNO_3 ; 10 % раствор NaOH .

При действии азотной кислоты на циклические аминокислоты происходит нитрование бензольного кольца с образованием нитросоединений желтого цвета; при добавлении щелочи желтое окрашивание переходит в оранжевое. Например, в реакции с фенилаланином образуется динитрофенилаланин, имеющий желтый цвет, а добавление едкого натрия приводит к образованию натриевой соли динитрофенилаланина – оранжевого цвета.

В пробирку вносят пипеткой 3 см^3 раствора белка, затем по каплям добавляют 1 см^3 конц. HNO_3 (8–12 капель) и осторожно нагревают пробирку с пробой в пламени спиртовой горелки. В пробе при этом должен появиться осадок свернувшегося белка; осадок и раствор окрашиваются в желтый цвет.

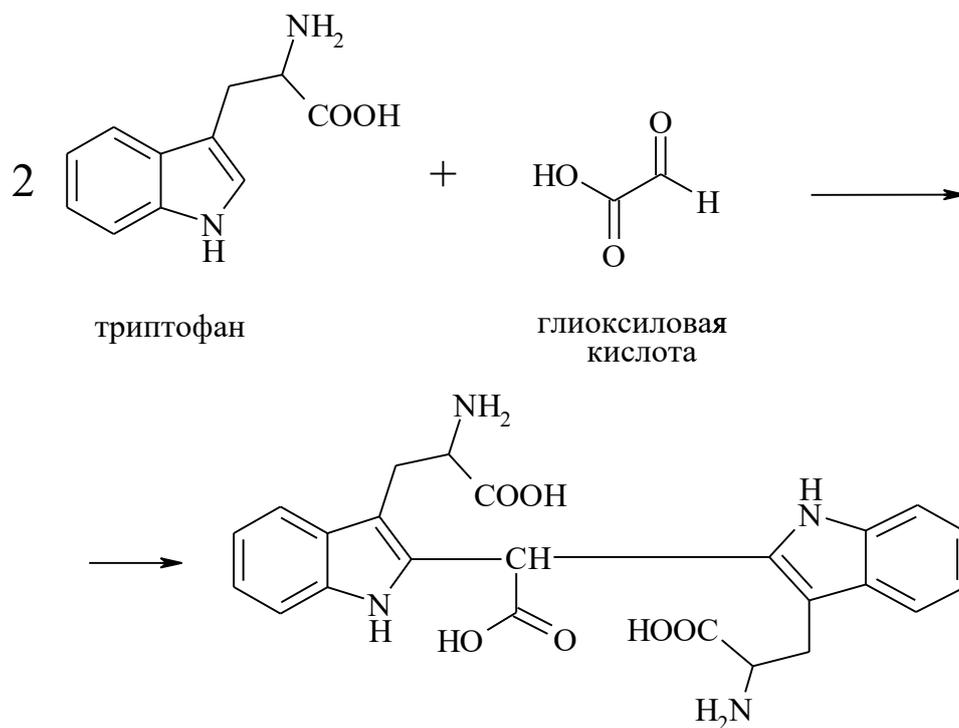
Далее пробирку охлаждают до комнатной температуры и осторожно вносят в пробирку с той же пробой избыток 10,0 % раствора едкого натрия, желтая окраска при этом должна перейти в красно-оранжевую:



4) Реакция Адамкевича является характерной на содержание в белке триптофана, образующего в кислой среде цветные продукты конденсации со многими альдегидами.

Реактивы: концентрированная серная кислота; ледяная уксусная кислота.

Белок с глиоксиловой кислотой в присутствии концентрированной серной кислоты образует продукт красно-фиолетового цвета (глиоксиловая кислота содержится как примесь в ледяной уксусной кислоте). При нагревании 2 молекулы триптофана взаимодействуют с глиоксиловой кислотой, в результате чего образуется новое окрашенное соединение:



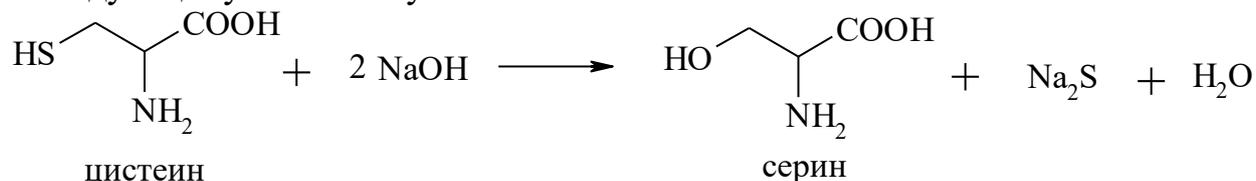
В пробирку наливают от нескольких капель до 1 см³ раствора белка и 1 см³ ледяной уксусной кислоты. Наклонив пробирку, по стенке приливают 1 см³ конц. серной кислоты. При наличии в пробе белковых веществ на границе двух несмешивающихся жидкостей (уксусная кислота и серная кислота) через определенное время проявится оранжево-багряное или красно-фиолетовое кольцо. При выдерживании пробы в штативе интенсивность окраски усиливается.

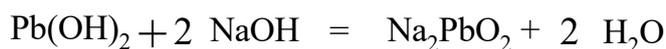
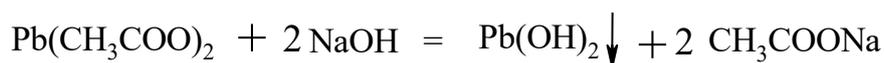
5) Реакция на серосодержащие аминокислоты (реакция Фоля) основана на способности белков, в составе которых есть цистеин и метионин, при нагревании в щелочной среде образовывать сульфид натрия, который в результате реакции с плюмбитом натрия переходит в осадок сульфида свинца черного цвета.

Реактивы: 20 % раствор едкого натрия, 10 % раствор уксуснокислого свинца.

В пробирку вносят 2 см³ анализируемого белоксодержащего раствора, добавляют 2 см³ 20 % раствора едкого натрия и несколько капель 10 % раствора ацетата свинца. Полученную смесь медленно нагревают до кипения.

Если образующийся при нагревании белый осадок из белого постепенно переходит в бурый, потом – в черный, это является признаком содержания в белке атомов серы (серосодержащих аминокислот), вступающих в реакции по следующему механизму:





По каждой реакции следует записать в тетрадь свои наблюдения, отметив особенности каждой реакции: окраску, прозрачность раствора, наличие осадка и т. п. В заключение по каждой реакции сделать вывод о присутствии в исследуемом растворе белка искомым аминокислот, функциональных групп или химических связей.

Лабораторная работа №4 «Определение количества и качества сырой клейковины»

Цель работы – получить количественную и качественную характеристику сырой клейковины, чтобы определить хлебопекарные достоинства исследуемой муки.

Количество и качество клейковины в зерне пшенице определяется в соответствии с ГОСТ 13586.1–68 «Зерно. Методы определения количества и качества клейковины в пшенице», в пшеничной муке – по методике ГОСТ 27839–88 «Мука пшеничная. Методы определения количества и качества клейковины».

Содержание клейковины в зерне пшеницы является очень важным показателем качества, поскольку от этого зависит и содержание клейковины в производимой муке. Для получения муки хлебопекарного назначения необходимо использовать зерно пшеницы с содержанием не менее 24,0 % сырой клейковины. В соответствии с ГОСТ Р 52189–2003 «Мука пшеничная. Общие технические условия», в муке содержание сырой клейковины должно составлять: в сорте экстра и высшем – не менее 28,0 %, в первом сорте – не менее 30,0 %, во втором сорте – не менее 25,0 %, в обойной муке – не менее 20,0 %.

Качество клейковины характеризуется совокупностью её упругих и эластичных свойств, определяется на приборе ИДК (разных модификаций) и выражается в единицах шкалы используемого прибора (ед. ИДК). По полученному в ед. ИДК значению определяют группу качества клейковины.

Для производства хлеба стандартного качества клейковина должна быть эластичной, упругой, со средней растяжимостью. Излишне упругая, неэластичная (сильная) клейковина приобретает оптимальные свойства после периода «созревания» муки. Слабая, легко-растяжимая клейковина – напротив, лишена упругости, тестовые заготовки из муки с такой клейковиной расплываются и прилипают к технологическому оборудованию. Самосогревание или прорастание зерна изменяют свойства клейковины: она становится тёмной (жёлтой), коротко-рвущейся, неэластичной.

Качество клейковины в муке хлебопекарного назначения должно быть не ниже II группы, в макаронной муке – I группы. Клейковина I группы – средней или длинной растяжимости, эластичная, II – любой растяжимости и удовлетворительной эластичности, III – малоэластичная, с короткой растяжимостью,

плывущая или крошащаяся. При этом *растяжимостью* называют способность клейковины растягиваться в длину, это свойство определяют путём растягивания шарика из 4 г сырой клейковины над линейкой до разрыва (в течение 10 с), после чего клейковину характеризуют как короткорвущуюся – менее 10 см, средней растяжимости – от 10 до 20 см – и хорошо растяжимую – более 20 см. *Эластичностью* называют свойство клейковины постепенно восстанавливать первоначальную форму после устранения внешнего воздействия. Эластичная клейковина восстанавливает свою форму, плохая – не восстанавливает либо восстанавливает не полностью.

Определение количества и качества клейковины в пшеничной муке

На лабораторных весах взвешивают навеску муки 25,0 г, пересыпают в дежу тестомесилки. Мерным цилиндром отмеривают 14 см³ проточной водопроводной воды и выливают в дежу с мукой (если тестомесилка имеет специализированный дозатор, то вода вливается в дежу из дозатора). Дежу подсоединяют к головке тестомесилки и нажимают кнопка «Пуск», замешивая комочек теста в форме цилиндра. Кусочки теста, оставшиеся на штифтах головки тестомесилки или на стенках и дне дежи, собирают и присоединяют к основному куску теста. При отсутствии в лаборатории автоматизированной тестомесилки замес теста ведут ручным способом, в фарфоровой чашке или ступке (вначале пестиком или шпателем, затем – руками, пока тесто не примет равномерную консистенцию); тесто в конце ручного замеса формируют в шарик. Частицы теста, прилипшие к пестику или шпателю или стенкам чашки присоединяют к основной массе теста.

Если тесто при замесе образует крошащуюся массу – не замешивается, то увеличивают количество воды для замеса (на 1 см³). Если тесто замесилось неравномерно, то его не вынимают из дежи, а проводят повторный замес, ещё раз нажав кнопку «Пуск».

Далее замешанное тесто кладут для набухания на 20 минут в фарфоровую чашку и закрывают сверху стеклом, чашкой Петри или любой другой крышкой, чтобы верхние слои теста не подсыхали. В течение этого времени белковые вещества поглощают воду, набухают, начинает формироваться клейковина.

По окончании отлежки начинают отмывание клейковины, сначала под слабой струей водопроводной воды, над ситом. Температура промывочной воды должна поддерживаться в пределах от 18 °С до 20 °С.

Клейковину отмывают в наполненной наполовину водой чашке вместимостью 2–3 дм³ либо над ситом непосредственно под краном с водопроводной водой. Соли жесткости и присутствующий в водопроводной воде хлор несколько укрепляют клейковину.

Тесто опускают в воду на ладони одной руки, а пальцами другой руки его разминают. Отмывание сначала ведут медленно, чтобы не отрывались кусочки теста, затем более интенсивно, разминая середину комочка. **КАТЕГОРИЧЕСКИ ЗАПРЕЩАЕТСЯ РВАТЬ И ПЕРЕКРУЧИВАТЬ ТЕСТО** (и клейковину) в процессе отмывания.

От вымываемых из теста веществ промывная вода в чашке вскоре стано-

вится мутной, поэтому промывочную воду заменяют новой порцией чистой воды через каждые 3 минуты, сливая мутную воду в раковину через сито. Оторвавшиеся кусочки теста или клейковины, задержанные ситом, присоединяют к общей массе клейковины.

Отмывание клейковины ведут до практически полного отмывания крахмала, оболочек и водорастворимых белков, при их отсутствии в отмываемой клейковине свежая порция промывной воды будет прозрачной, без мути.

Окончание отмывания клейковины удобно определять следующим образом: под струей воды ополоснуть руку и клейковину, стряхнуть лишнюю воду и пальцами аккуратно выжать из клейковины несколько капель воды в стакан с чистой водой. Если упавшие в стакан капли дадут муть, то отмывание необходимо продолжить. При отсутствии мути начинают руками подсушивать клейковину (отжимая ее между двумя ладонями, которые периодически вытирают сухим полотенцем). Клейковину следует несколько раз вывернуть, не допуская ее разрывания, и снова отжимать между ладонями.

Как только клейковина начнет слегка прилипать к рукам, подсушивание прекращают. Клейковину взвешивают, записывая массу (m_1) сырой клейковины с точностью до 0,01 г. Затем еще раз промывают клейковину в течение 5 минут в новой порции воды, вновь отжимают-подсушивают и взвешивают, записывая в тетрадь второе значение массы сырой клейковины (m_2), затем – третье и т. д.

Отмывание считается законченным при условии $\Delta = m_2 - m_3 \leq 0,10$ г. Количество сырой клейковины X , в %, рассчитывают по последнему результату, полученному при отмывании и взвешивании клейковины, по формуле:

$$X = (m_{\text{клейковины}} : m_{\text{навески}}) \times 100\%, \quad (6)$$

где $m_{\text{клейковины}}$ – масса сырой клейковины, г;

$m_{\text{навески}}$ – масса навески муки, взвешенной для отмывания клейковины, г.

Расчет ведут до второго знака после запятой.

Если при отмывании клейковина получается крошащаяся либо формируется в губчатую, легко рвущуюся массу, но шарик из нее не получается, то её относят к III группе по качеству, не проводя анализа на ИДК.

После окончания отмывания от подсушенной и взвешенной клейковины отделяют навеску массой $4,0 \pm 0,1$ г, обминают ее несколько раз пальцами, придавая ей форму шара с ровной поверхностью. При массе всей отмытой клейковины менее 4,0 г повторно взвешивают муку, увеличив вдвое массу навески, и отмывают клейковину заново.

Сформованный шарик клейковины кладут на 15 минут в чашку с водой температурой 18–20 °С для набухания белков клейковины и восстановления их структуры. После отлежки в воде клейковину вынимают из чашки, стряхивая капли воды, и помещают клейковинный шарик по центру предметного столика ИДК. При этом внешние механические воздействия на шарик клейковины не допускаются.

Оценку качества клейковины ведут на приборе ИДК-1 или ИДК-1М. Прибор включают за 15 минут до начала работы. Разместив пробу клейковины

на предметном столике прибора, нажимают кнопку «Пуск» (удерживая ее 2–3 с), в это время на шарик клейковины должен опуститься пуансон, тогда кнопку «Пуск» отпускают. Сжатие клейковины пуансоном продолжается 30 секунд и прекращается автоматически, при этом загорается лампочка «Отсчет». После этого по шкале прибора отсчитывают и записывают в тетрадь показания прибора, округляя их с точностью до 5 условных единиц (например: 50 ед. ИДК; 55 ед. ИДК).

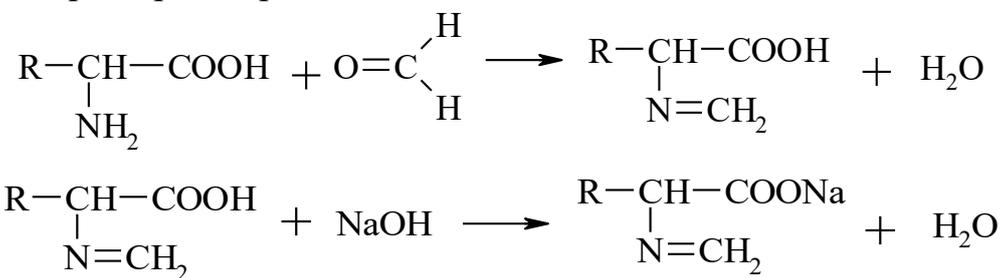
Далее одной рукой нажимают кнопку «Тормоз», другой рукой в это время принудительно поднимают пуансон в верхнее положение. Клейковину убирают, предметный столик прибора протирают. Группу качества клейковины и ее характеристику определяют в соответствии с таблицей 7.

В производственных лабораториях в карточках анализа или в лабораторных журналах количество клейковины указывается с точностью до второго десятичного знака. В документах о качестве – с точностью до 1,0 %. Допустимое расхождение в определении количества клейковины – не более 2,0 %, по качеству – не более 5 ед. ИДК. В заключение необходимо сделать вывод о том, соответствует ли анализируемая мука по содержанию и качеству клейковины требованиям ГОСТ Р 52189–2003.

Лабораторная работа №5 «Определение количества растворимого белка методом формольного титрования»

Цель работы – научиться определять количество растворимого белка в исследуемом образце методом формольного титрования и анализировать полученные данные для последующих выводов о качестве продукта.

Методика основана на повышении кислотности анализируемой жидкой пробы, содержащей аминокислоты и/или белки, добавлением нейтрального раствора формалина. При взаимодействии формалина с растворами белков и аминокислот оба водородных атома свободных аминогрупп замещаются на метильную группу формалина. Как следствие, начинают сильнее проявляться кислые свойства карбоксильных групп, на нейтрализацию которых и расходуется новая порция раствора щелочи:



Метод применяется при определении содержания белка в молоке и его растительных аналогах.

Перед выполнением анализа проверяют, какой объем раствора щелочи требуется для нейтрализации кислотности самого формалина. Для этого мерной пипеткой в чистую колбу вносят 2 см³ формалина, добавляют 5–6 капель 1 % раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором щелочи до появления блед-

но-розового окрашивания. Записывают израсходованный объем раствора щелочи как V_0 .

Далее в коническую колбу для титрования мерной пипеткой отбирают 10 см^3 пробы (допускается отбирать пробы по массе, $10,0 \pm 0,2 \text{ г}$). В эту же колбу вносят 7–10 капель 1 % раствора фенолфталеина. Пробу перемешивают и титруют 0,1 н раствором щелочи до устойчивого в течение 30 с. бледно-розового окрашивания. Этот объем раствора щелочи при расчетах не учитывают.

В оттитрованный раствор вносят пипеткой 2 см^3 формалина, после чего содержимое колбы перемешивают. Бледно-розовая окраска у раствора пробы при этом исчезнет. Уровень раствора щелочи в бюретке доводят до нуля, после чего начинают вновь титровать содержимое колбы раствором щелочи, до повторного появления устойчивого в течение 30 с. бледно-розового окрашивания.

В тетрадь записывают объем раствора щелочи ($V_{\text{щ}}$, в см^3), использованный на титрование пробы после добавления формалина.

Содержание белка в растворе (B , %) рассчитывают по формуле:

$$B = (V_{\text{щ}} - V_0) \times 0,96, \quad (7)$$

где 0,96 – коэффициент пересчета значения на общий белок.

Контрольные вопросы:

1) Сформулируйте определения понятий «белок» и «аминокислота». В чем состоит взаимосвязь между этими соединениями? Проиллюстрируйте структурными формулами.

2) Приведите классификацию белков по выполняемым функциям. Какие из них имеют значение при переработке растительного сырья?

3) Какие группы (фракции) белков выделяют с учетом их растворимости? Какие из групп преобладают в составе хлебопекарных злаков, крупяных культур?

4) Охарактеризуйте классификационные признаки аминокислот. Объясните, как эти признаки связаны с физико-химическими и технологическими свойствами белков?

5) Какие типы связей участвуют в построении белковых молекул? Каким образом знания о механизмах образования и разрушения связей в белковой молекуле используются в технологической практике?

6) Каким образом можно выделить белок из растительного материала?

7) Назовите методы, которые используют при анализе белков в биохимическом анализе, в производственных и экспертных лабораториях.

8) Какими аналитическими методами можно подтвердить наличие в пробе белков?

9) В чем заключается проведение качественных реакций? Какие из реакций являются общими, какие – специфичными? Охарактеризуйте порядок выполнения важнейших качественных реакций.

10) Возможна ли количественная интерпретация качественных реакций? В каком случае?

11) Что называется клейковиной? В чём состоит различие между сырой и сухой клейковиной?

12) Изложите порядок определения количества сырой клейковины. Какие нормативы по содержанию сырой клейковины установлены для зерна, для хлебопекарной муки?

13) Как проводят оценку качества клейковины? С какой целью тесто и клейковину кладут на отлежку? Какие процессы протекают при этом в пробе?

14) Что такое «группа качества клейковины»? Какие группы качества клейковины различают и как их определить с помощью прибора? Возможно ли определение качества клейковины вручную?

15) На чем основан метод формольного титрования белков?

ТЕМА 4. ФЕРМЕНТЫ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Ферменты (энзимы) – биологические катализаторы процессов обмена веществ, имеющие белковую природу. Ускоряют биохимические реакции, но сами при этом не расходуются.

Вещество, превращения которого катализируется ферментом, называется **субстратом**. Фермент, соединяясь с субстратом, образует **фермент-субстратный комплекс** (рисунок 9).

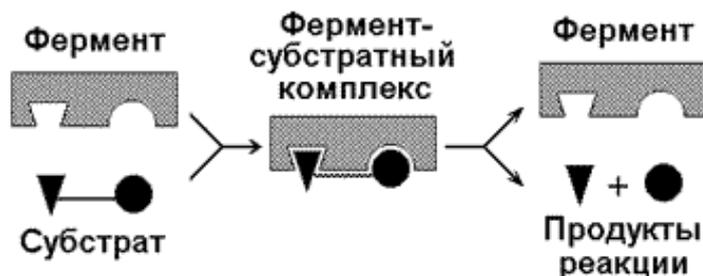


Рисунок 9 – Механизм образования фермент-субстратного комплекса

Все известные ферменты подразделяются на 6 **классов**, в основу классификации положен важнейший признак – катализируемая реакция:

- оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции);
- трансферазы (перенос функциональных групп от одного соединения к другому). Катализируют реакции межмолекулярного переноса химических групп и остатков;
- гидролазы (гидролитическое расщепление внутримолекулярных связей с участием воды);
- лиазы катализируют реакции присоединения групп по двойным связям и обратные реакции отрыва таких групп;
- изомеразы (изомерные превращения), катализируют реакции изомеризации;
- лигазы (синтетазы – синтез с затратой молекул АТФ). Катализируют реакции соединения двух молекул, сопряженные с расщеплением пирофосфатной связи в молекуле аденозинтрифосфата (АТФ) или аналогичного нуклеотидтрифосфата.

Ферменты каждого класса делят на **подклассы**, руководствуясь строением субстратов. В подклассы объединяют ферменты, действующие на сходно построенные субстраты. Подклассы разбивают на **подподклассы**, в которых уточняется структура химических групп, отличающих субстраты друг от друга. Внутри подподклассов перечисляют **индивидуальные виды ферментов**.

Лабораторная работа №6 «Определение ферментативной активности муки и солода»

Цель работы – научиться определять и анализировать ферментативную активность муки и солода, чтобы прогнозировать их технологические свойства и качество конечной продукции.

Определение автолитической активности муки

Известно три типа амилаз: α -амилаза (КФ 3.2.1.1), β -амилаза (КФ 3.2.1.2) и глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3).

α -амилаза содержится в пшеничном, ржаном, ячменном, овсяном, просянном солоде, в слюне и соке поджелудочной железы, в плесневых грибах и бактериях. β -амилаза встречается в проросшем и в непроросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя, овса, проса, в соевых бобах, клубнях картофеля, присутствует в грибах и бактериях; у животных и человека отсутствует. Глюкоамилаза синтезируется плесневыми грибами; образуется в животных тканях.

При воздействии на крахмал α -амилаза беспорядочно гидролизует в нём глубинные $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидные связи (рисунок 10):

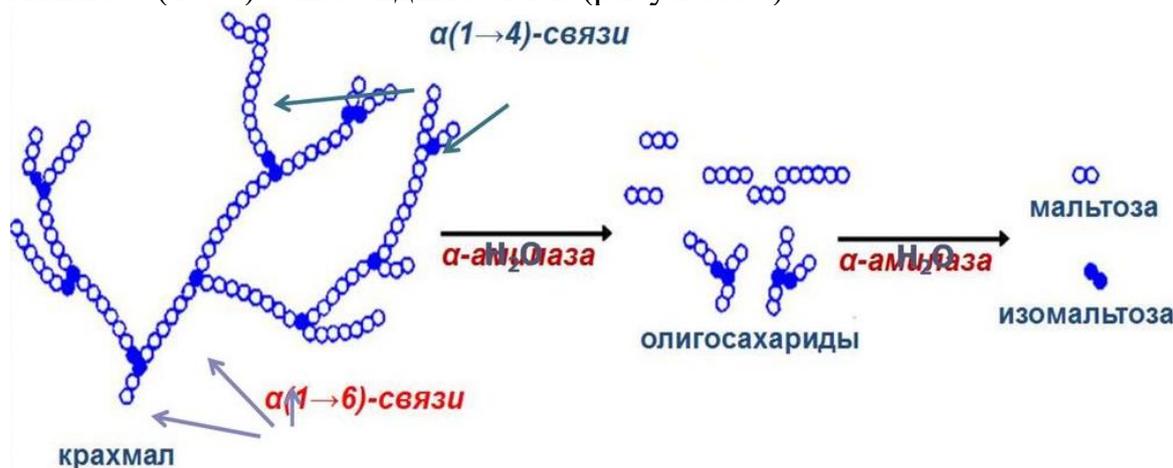


Рисунок 10 – Воздействие α -амилазы на крахмал

Сначала под воздействием α -амилазы образуются *декстрины* – фрагменты молекулы крахмала, имеющие различную молекулярную массу. Поэтому α -амилазу называют также декстриногенамилазой.

Многие декстрины реагируют с йодом, но цвет образующегося комплекса зависит от размера полимера:

- *амилодекстрины* имеют среднюю $M_r=10000$ Да, окрашиваются йодом в сине-фиолетовый цвет;
- *эритродекстрины* имеют $M_r=4000\dots6000$ Да, окрашиваются йодом в красно-бурый цвет;
- *ахроодекстрины* имеют среднюю $M_r=3700$ Да, практически не окрашиваются йодом;
- *мальтодекстрины* имеют среднюю $M_r=1000$ Да, йодом не окрашиваются.

Поскольку α -амилаза не может расщеплять фрагменты крахмала, содержащие менее 3 остатков глюкозы, в конечном счете крахмал гидролизует α -амилазой с образованием мальтозы, глюкозы и изомальтозы (все они имеют α -форму, что и отражено в названии фермента; рисунок 11):

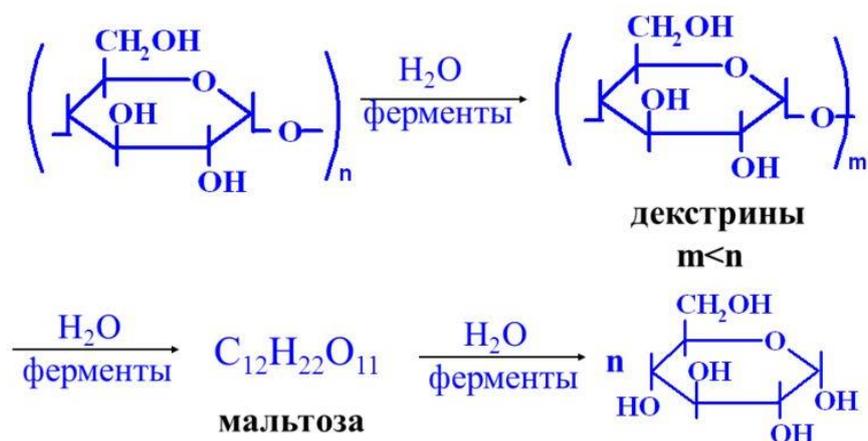


Рисунок 11 – Расщепление фрагментов крахмала ферментами

β -амилаза, как и α -амилаза, гидролизует в крахмале $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -гликозидные связи. Однако действует она упорядоченно, последовательно отщепляя от нередуцирующих концов его компонентов остатки мальтозы до тех пор, пока не встретится точка ветвления, образованная $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -гликозидной связью.

Под воздействием β -амилазы амилоза расщепляется на мальтозу на 100 %. Минимальный фрагмент амилозы, расщепляемый β -амилазой, содержит 4 остатка глюкозы. У амилопектина β -амилаза отщепляет мальтозу только от наружных ветвей, не затрагивая крупной, сильно разветвленной «сердцевины», называемой остаточным декстрином. Амилопектин гидролизруется β -амилазой лишь на 54 %.

Поскольку основным продуктом гидролиза крахмала при воздействии β -амилазы является мальтоза, этот фермент называют также сахарогенамилазой. В названии « β -амилаза» отражено то, что мальтоза при отщеплении от крахмала переходит в β -форму. Действие β -амилазы прекращается за 2–3 остатка глюкозы до точки ветвления (рисунок 12):

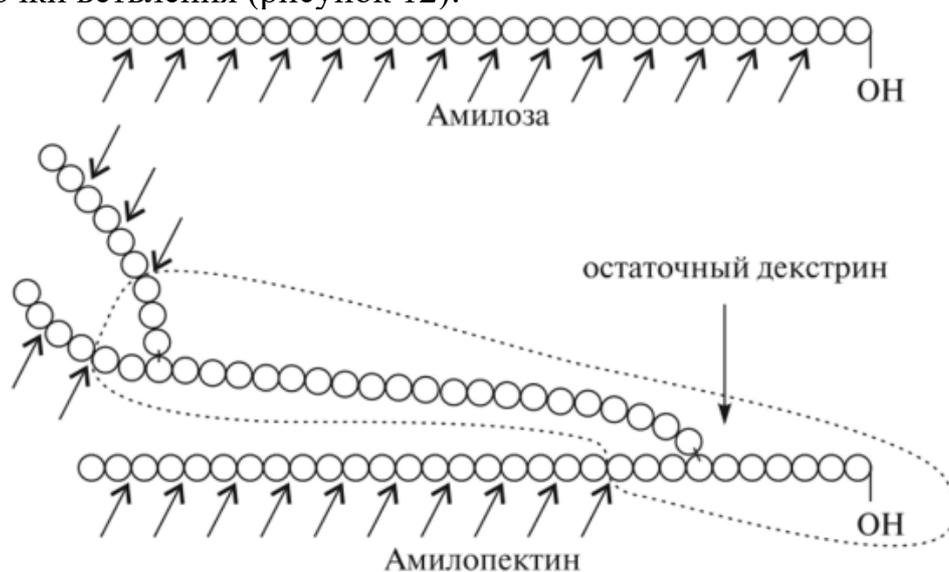
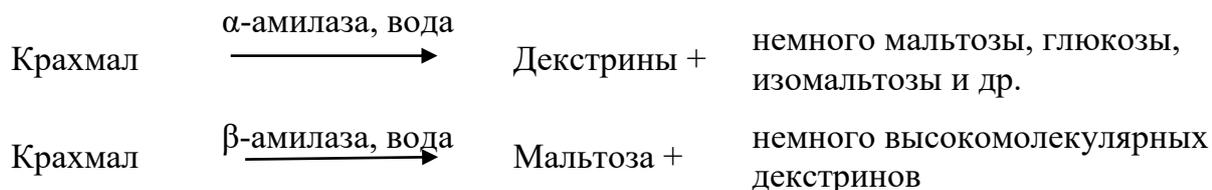


Рисунок 12 – Гидролиз амилопектина β -амилазой

Таким образом, α -амилаза беспорядочно «крошит» крахмальные зерна, коренным образом нарушая структуру крахмала муки, а β -амилаза шелушит

крахмальные зерна, при этом их «сердцевины» остаются незатронутыми. α -амилаза оказывает на крахмал декстринирующее воздействие, а β -амилаза – осаживающее:



По отдельности ни воздействие α -амилазы, ни воздействие β -амилазы на крахмал не приводит к его полному гидролизу. Однако при их совместном воздействии крахмал гидролизуется до мальтозы на 95 %.

Ни α -, ни β -амилаза не способны расщеплять в крахмале $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидные связи. В отличие от них, глюкоамилаза может гидролизовать в крахмале как $\alpha(1\rightarrow4)$, так и $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидные связи. $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидную связь глюкоамилаза расщепляет только в том случае, если за ней следует $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидная связь. Этот фермент последовательно отщепляет от нередуцирующих концов амилозы и амилопектина молекулы глюкозы в β -форме.

Глюкоамилаза хорошо расщепляет высокомолекулярные субстраты; низкомолекулярные субстраты гидролизует медленно. При повышении степени гидролиза субстрата и концентрации глюкозы в реакционной среде (выше 60–70 %) глюкоамилаза начинает проявлять трансферазную активность, в результате чего образуются изомальтоза, паноза, изомальтотриоза и другие продукты реакции; выход глюкозы снижается.

При удалении глюкозы из реакционной среды трансферазная активность глюкоамилазы снижается и крахмал с помощью этого фермента может быть полностью гидролизован до глюкозы.

Амилолитическая активность зерна и муки, обусловленная в основном наличием в них α -амилазы, характеризует способность фермента катализировать гидролиз крахмала до неокрашиваемых йодом продуктов. При наличии в препарате α -амилазы и глюкоамилазы этим методом определяется суммарное действие всех амилолитических ферментов.

За единицу амилолитической активности в этом методе принято такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 г растворимого крахмала до продуктов, неокрашиваемых йодом, за 1 час при температуре 30 °С в строго определенных условиях.

Амилолитическую активность (АС) выражают числом указанных единиц в 1 г препарата, культуры или в 1 см³ раствора. Величина АС показывает, сколько граммов крахмала может быть гидролизовано до неокрашиваемых йодом соединений 1 г препарата, культуры или 1 см³ раствора за 1 ч в условиях определения. Окончание реакции контролируют визуально по йодной пробе.

Чувствительность метода определяют минимальным количеством времени, за которое можно визуально уловить изменение окраски йода. Допускают, что скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству применяемого фермента и остается постоянной на протяжении от 5 мин до 1 ч, то есть реакция подчиняется закону реакции нулевого порядка. Кроме того,

установлено влияние величины рН и химической природы буфера на величину АС. С ацетатным буфером (рН=4,7) величина АС у грибных препаратов в среднем в 1,5 раза выше, чем при определении с фосфатным буфером (рН=6,0). Поэтому, при определении величины АС грибных культур рекомендуется брать ацетатный буфер.

Недостатком метода является нечеткость визуального определения окончания реакции.

Проведение анализа

Проведение метода определения автолитической активности муки регламентировано ГОСТ 27495–87.

Сущность метода заключается в определении количества водорастворимых веществ, образующихся при прогревании водно-мучной болтушки, с помощью рефрактометра.

Навеску муки массой (1,00±0,05) г переносят в фарфоровый стаканчик, предварительно взвешенный вместе со стеклянной палочкой. Затем пипеткой добавляют (10,00±0,02) мл дистиллированной воды и содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой, остающейся в стаканчике в течение всего определения.

Заполненные стаканчики погружают в равномерно кипящую водяную баню так, чтобы уровень жидкости в стаканчиках был на 0,75–1,0 см ниже уровня воды в бане. Прогревание проводят в течение 15 минут, помешивая палочкой первые 1–2 мин для равномерной классификации. Помешивание ведут одновременно в двух стаканчиках.

По окончании клейстеризации стаканчики накрывают большой стеклянной воронкой или каждый стаканчик отдельной воронкой для предотвращения излишнего испарения. По истечении прогревания стаканчики одновременно (вместе с крышкой) вынимают из бани и к их содержимому немедленно при постоянном помешивании приливают по (20±0,02) мл дистиллированной воды, после чего энергично перемешивают и охлаждают до комнатной температуры. Затем общую массу охлажденного автолизата доводят на весах до (30±0,05) г, для чего обычно требуется прилить около 0,2–0,5 г воды.

Далее содержимое стаканчиков вновь тщательно перемешивают палочкой (до появления пены) и фильтруют через складчатый фильтр. Ввиду того, что при этом разведении получаются вязкие, трудно фильтрующиеся автолизаты, рекомендуется на фильтр сливать слой жидкости, а осадок оставлять в стаканчике. Фильтрацию каждой пробы следует начинать непосредственно перед определением сухих веществ на рефрактометре. При фильтрации две первые капли отбрасывают, а последующие 2–3 капли наносят на призму рефрактометра.

Для пересчета на сухое вещество определяют влажность муки.

Количество водорастворимых веществ в муке (X) в пересчете на сухое вещество в процентах вычисляют по формуле (8):

$$X = \frac{\alpha \cdot 100}{100 - W_m}, \quad (8)$$

где a – количество сухих веществ, определяемых по таблице, прилагаемой к рефрактометру, или непосредственно на шкале прибора, умноженное на 30 %;
 W – влажность муки, %.

Вычисления проводят с точностью до первого десятичного знака. За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не должно превышать 3 %.

При количестве водорастворимых веществ по автолитической пробе более 55 % на сухое вещество мука считается с повышенной автолитической активностью, при 55 % и менее – мука с нормальной автолитической активностью.

Лабораторная работа №7 «Определение активности амилазы солода по методу Вольгемута»

Цель работы – научиться определять и количественно оценивать активность амилазы солода по методу Вольгемута для контроля качества солода и его технологических свойств.

Метод Вольгемута основан на определении минимального количества фермента, способного при определенных условиях полностью гидролизовать 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Амилазная активность солода выражается количеством миллилитров 0,1 % раствора крахмала, которое может быть гидролизовано 1 мл вытяжки из солода при температуре 38 °С в течение 30 мин. В норме амилазная активность равна от 160 до 320 единиц активности.

Метод Вольгемута широко используется в клинической практике для определения амилазной активности крови и мочи, в пивоварении – для определения амилазной активности солода. Резкое повышение амилазной активности в крови и моче (в 10–30 раз) наблюдается при острых панкреатитах, опухолях поджелудочной железы.

Материалы и реактивы: вытяжка из солода зерновых, разбавленная в 10 раз; 0,1 % раствор крахмала; 0,1 % раствор йода в 0,2 % растворе иодида калия.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, капельницы, термостат.

Ход работы. В десять пробирок наливают по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку прибавляют 1 мл разведенной в 10 раз вытяжки, перемешивают, 1 мл смеси переносят во вторую пробирку. Содержимое этой пробирки снова перемешивают и 1 мл переносят в третью пробирку и так до десятой пробирки. Из последней пробирки отбирают 1 мл и выливают. Таким образом, в каждой последующей пробирке содержание фермента в два раза меньше, чем в предыдущей. Разведение вытяжки в десяти пробирках составит: 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280; 1:2560; 1:5120; 1:10240.

Далее во все пробирки прибавляют по 1 мл воды и по 2 мл раствора крахмала, перемешивают и помещают в термостат при температуре 38 °С на 30 мин. После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой для прекращения действия фермента, добавляют по две капли раствора йода, хорошо

взбалтывают и наблюдают за изменением окраски. При реакции с йодом жидкость окрашивается в желтый, розовый и фиолетовый цвет.

Отметив, при каком разведении произошел полный гидролиз крахмала с минимальным содержанием фермента (пробирка с желтоватой окраской содержимого), по количеству неразведенной вытяжки (А) в данной пробирке рассчитывают амилазную активность вытяжки (А мл вытяжки расщепляет Х мл 0,1 % раствора крахмала).

Например, желтый цвет появился в четвертой пробирке, где вытяжка разведена в 160 раз. Это количество вытяжки способно гидролизовать 2 мл 0,1 % раствора крахмала, а 1 мл неразведенной вытяжки в тех же условиях гидролизует 320 мл: $X = 2 \times 160 / 1$. Следовательно, амилазная активность равна 320.

Лабораторная работа №8 «Определение активности каталазы по Баху»

Цель работы – освоить метод количественного определения активности каталазы по Баху для оценки её каталитической способности в разложении перекиси водорода.

Метод основан на определении количества пероксида водорода, оставшегося после действия на него каталазы, титрованием на него раствора KMnO_4 . Реакция протекает по уравнению:



1 мл 0,1 моль/л раствора перманганата калия соответствует 85 мг пероксида водорода.

Материалы и реактивы: препарат каталазы (1 г проростков солода ячменного растирают в фарфоровой ступке с 6 мл фосфатного буфера и фильтруют); 10 %-ный раствор H_2SO_4 ; 0,1 %-ный раствор пероксида водорода на фосфатном буфере, $\text{pH}=7,0$ (35,0 мл 0,2 моль/л NaH_2PO_4 в 13,6 мл 0,2 моль/л NaH_2PO_4); 0,1 моль/л раствор KMnO_4 .

Оборудование: колбы емкостью 100 мл, пипетки, бюретки, термостат.

Ход работы. В две колбы вносят по 2 мл препарата каталазы, в одну из них (проба) прибавляют 1 мл 10 %-ного раствора H_2SO_4 , затем наливают по 2 мл раствора пероксида водорода в каждую колбу, ставят в термостат на 40 мин при температуре 38 °С. По истечении времени инкубации во вторую колбу (контроль) прибавляют 1 мл 10 %-ного раствора H_2SO_4 и оба раствора титруют 0,1 М раствором KMnO_4 до появления стойкого розового окрашивания от излишка перманганата калия.

Активность каталазы определяют по количеству разложенного пероксида водорода (мл) и рассчитывают по формуле (9):

$$C = (B - A) \times Q, \quad (9)$$

где $(B - A)$ – разность результатов титрования контрольного и исследуемого образцов 0,001 н раствором KMnO_4 , мл;

Q – количество пероксида водорода (85 мг), соответствующее 1 мл 0,1 моль/л раствора KMnO_4 .

Капельный метод (по Климовскому и Родзевич)

Амилолитическая активность, обусловленная в основном наличием в препарате α -амилазы, характеризует способность фермента катализировать гидролиз крахмала до неокрашиваемых йодом продуктов. При наличии в препарате α -амилазы и глюкоамилазы этим методом определяется суммарное действие всех амилолитических ферментов.

За единицу амилолитической активности в этом методе принято такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 г растворимого крахмала до продуктов, неокрашиваемых йодом, за 1 час при температуре 30 °С в строго определенных условиях. Амилолитическую активность АС выражают числом указанных единиц в 1 г препарата, культуры или в 1 см³ раствора. Величина АС показывает, сколько граммов крахмала может быть гидролизовано до неокрашиваемых йодом соединений 1 г препарата, культуры или 1 см³ раствора за 1 ч в условиях определения. Окончание реакции контролируют визуально по йодной пробе.

Чувствительность метода определяют минимальным количеством времени, за которое можно визуально уловить изменение окраски йода. Допускают, что скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству применяемого фермента и остается постоянной на протяжении от 5 мин до 1 ч, то есть реакция подчиняется закону реакции нулевого порядка. Кроме того, установлено влияние величины рН и химической природы буфера на величину АС. С ацетатным буфером (рН=4,7) величина АС у грибных препаратов в среднем в 1,5 раза выше, чем при определении с фосфатным буфером (рН=6,0). Поэтому, при определении величины АС грибных культур рекомендуется брать ацетатный буфер.

Недостатком метода является нечеткость визуального определения окончания реакции.

Материалы и реактивы: ацетатный буфер с рН=4,7 для ферментов грибного происхождения; фосфатный буфер с рН=6,0 для ферментов бактериального происхождения; 1 %-ный раствор крахмала (раствор крахмала, употребляемый для анализа грибных препаратов, должен иметь рН=4,7, для анализа бактериальных препаратов – 6,0); растворы йода. Для приготовления основного раствора йода в тарированный стаканчик с притертой крышкой отвешивают 4,4 г йодида калия, 1,4 г металлического йода, добавляют около 2 см³ дистиллированной воды. Стаканчик закрывают крышкой, содержимое перемешивают и после растворения йода переводят раствор в мерную колбу объемом 100 см³ с притертой пробкой. Доводят объем дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы хранят в темном прохладном месте. Основным раствором йода можно пользоваться в течение 30 дней со дня его приготовления. Рабочий раствор йода готовят из основного раствора. Для этого 20 см³ основного раствора йода наливают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 4,4 г йодида калия и доводят общий объем раствора до 100 см³. Рабочий раствор йода может быть употреблен в течение шести дней после его приготовления.

Оборудование: широкие пробирки, стеклянные палочки, пипетки, стаканы объемом 50 мл, чашки Петри, термостат.

Ход работы. Для определения значения АС важно строго соблюдать условия реакции. Для этого предварительно все растворы – субстрат (1 % раствор крахмала), раствор фермента и дистиллированная вода должны быть нагреты до температуры 30 °С.

Субстрат в количестве 25 см³ (12,5 мл) помещают в широкую пробирку, в которую вставлена стеклянная палочка. 30 см³ (15 мл) вытяжки и 30 см³ (15 мл) воды наливают в отдельные пробирки, помещают в термостат и выдерживают при температуре 30 °С в течение 10 минут.

Затем в широкую пробирку к раствору крахмала, не вынимая пробирок из термостата, с помощью пипеток добавляют от 1 до 25 см³ исходного ферментного раствора и соответствующее количество воды так, чтобы общий объем реакционной смеси был 50 см³. Если ферментная вытяжка малоактивна, то можно внести только ее в количестве 25 см³, а воду вообще не добавлять.

Содержимое пробирки перемешивают палочкой и отмечают время по секундомеру, когда была добавлена вытяжка к раствору крахмала. Через каждые 60 секунд из пробирки, не вынимая ее из термостата, отбирают палочкой каплю пробы. Каплю помещают на белую фарфоровую пластину, соединяют эту каплю с каплей рабочего раствора йода и наблюдают окраску. Реакция расщепления крахмала считается оконченной, когда йод перестает давать изменение окраски при соединении с каплей испытуемого раствора в течение первых 10 секунд. Изменение окраски отчетливо видно на границе соприкосновения двух капель – йода и реакционной смеси.

Время, за которое происходит расщепление крахмала до продуктов, не окрашивающихся йодом, должно быть в пределах от 10 до 20 минут.

Если время гидролиза менее 10 мин, определение повторяют, беря на гидролиз меньше вытяжки и больше воды. Если гидролиз не заканчивается в течение 20 мин, то анализ также повторяют, беря на определение больше ферментной вытяжки и меньше воды. Количество ферментной вытяжки, которое необходимо брать на повторный анализ, вычисляют с учетом полученного времени гидролиза.

Если ферментная вытяжка имеет малую или слишком высокую активность, и количество ферментного раствора от 1 до 25 см³ не обеспечивает длительности гидролиза крахмала в течение 10...20 мин, то для анализа берут не 25 см³ раствора крахмала, а большее или меньшее его количество, например, 10 или 40 см³, внося соответствующую поправку в расчетную формулу (соответственно 0,1 или 0,4 вместо, обычных 0,25).

Величину значения амилолитической активности АС (ед./г) рассчитывают по формуле (10):

$$AC = \frac{0,25 \times 60}{n \times t}, \quad (10)$$

где 0,25 – количество крахмала, которое находится в 25 см³ 1 % раствора, г;
60 – коэффициент пересчета на 1 ч;

n – количество фермента, участвующего в реакции, г или см^3 (эта величина определяется с учетом концентрации исходной вытяжки и последующего разведения);

t – время, за которое произошло расщепление крахмала до не окрашиваемых йодом продуктов, мин.

Пример. Для анализа взята ферментная вытяжка воздушной культуры гриба. Исходный раствор приготовлен из расчета 5 г культуры в 100 см^3 забуференной воды. Известно, что данная культура очень активна, поэтому сделано дополнительное разведение исходного раствора: 20 см^3 доведено в мерной колбе до 50 см^3 дистиллированной водой и оттуда на анализ взято 2 см^3 , т.е. получена такая последовательность разведения:

$$5 \text{ г} \rightarrow 100 \text{ см}^3 \rightarrow 20 \text{ см}^3 \rightarrow 50 \text{ см}^3 \rightarrow 2 \text{ см}^3.$$

Для гидролиза $0,25$ крахмала (25 см^3 1 % раствора крахмала) ферментным раствором последнего разведения (2 см^3) потребовалось 12 мин. Тогда АС воздушно-сухой культуры (ед./г) составит:

$$AC = \frac{0,25 \times 60 \times 50 \times 100 \times 16}{12 \times 2 \times 20 \times 5} = 31,25. \quad (11)$$

При пересчете ферментативной активности следует учитывать не абсолютно сухое вещество ферментного препарата, а с учетом влажности. Расчет следует производить по формуле (12):

$$AC = \frac{AC \times 100}{100 - W}, \quad (12)$$

где W – влажность культуры или препарата.

До начала 50-х годов 20-го века все протеолитические ферменты по механизму их действия на субстрат подразделялись на две группы: протеиназы и пептидазы. Считалось, что гидролиз белка протекает в две стадии: сначала под действием протеиназ белки гидролизуются до пептидов, а затем на пептиды действуют пептидазы и расщепляют их до аминокислот. Однако позднейшие исследования показали, что под действием протеолитических ферментов белок может быть сразу превращен в аминокислоты, и прежняя классификация оказалась несостоятельной. В 60-х годах протеолитические ферменты классифицировали на четыре подкласса.

В настоящее время действует новая классификация, по которой все протеолитические ферменты были разделены на две основные группы: пептидазы и протеиназы. В первой группе протеолитических ферментов – пептидазах – подразделение по подклассам осуществляется на основе механизма расщепления пептидных связей в пептидах. Вторая группа протеолитических ферментов – протеиназы – имеет четыре подподкласса, в которых все ферменты подразделяются в зависимости от особенностей механизма катализа, установленного по функционированию активного центра фермента, а также влияния рН на его активность.

В спиртовой промышленности в качестве продуцентов протеолитических ферментов используются бактериальные и грибные культуры микроорганизмов.

Бактериальные протеиназы продуцируются бактериями *Bacillus subtilis* или *B.licheniformis*. Препараты содержат одну или две протеиназы, как правило, нейтральную и щелочную, гидролизующие белки до пептидов.

Грибные протеазы синтезируются микромицетами рода *Aspergillus*, *Rhizopus* и др. Наиболее широко распространена культура *A. oryzae* – продуцент кислых и слабокислых протеаз. Протеолитический комплекс гриба содержит как протеиназы, так и пептидазы, которые гидролизуют белки до коротких пептидов и свободных аминокислот.

Лабораторная работа №9 «Определение протеолитической активности ферментов методом Вильштеттера и Вальдшмидта-Лейтца»

Цель работы – научиться определять и сравнивать протеолитическую активность ферментов с использованием классических биохимических методов для контроля качества ферментных препаратов.

Метод основан на определении свободных карбоксильных групп в спиртовых растворах аминокислот и полипептидов.

Активность (ПС) выражается количеством миллиграммов аминного азота, которое образуется при гидролизе определенного количества 5 %-ного раствора желатина с величиной рН от 7,3 до 7,5 1 г препарата или 1 см³ ферментного раствора за 1 ч при температуре 40 °С.

За единицу протеолитической активности принимается количество фермента, которое образует 1 мг аминного азота за 1 ч при принятых условиях опыта.

Материалы и реактивы: 96 % этиловый спирт; 1 % раствор тимолфталина; 0,1 н раствор NaOH; субстрат – 5 % раствор желатина; вытяжка из анализируемого растения.

Приготовление вытяжки для определения протеолитической активности: навеска 0,25 г растительного материала помещается в фарфоровую ступку и растирается в течение 2,5 мин с 2,5 мл фосфатного буфера (рН=7,3), далее масса фильтруется.

Приготовление 5 % раствора желатина (субстрат): 5 г желатина предварительно замачивается в стеклянном стаканчике в 15–20 см³ дистиллированной воды в течение 20–30 мин. Набухший белок заливается 20–25 см³ буферного раствора с температурой 70–80 °С и тщательно перемешивается стеклянной палочкой. Растворившаяся часть сливается в мерную колбу объемом 100 см³, к нерастворившейся части добавляется еще 20...25 см³ буферного раствора, и полученный раствор снова переносится в эту же колбу. Охлажденный до 40 °С раствор желатина доводится до метки буферным раствором такой же температуры. Готовый раствор желатина хранится в холодильнике при температуре от 2 до 5 °С и используется для анализа в течение двух суток. Перед анализом раствор желатина нагревается до температуры 40 °С на водяной бане.

Оборудование: конические колбы объемом от 200 до 250 мл, мерные колбы объемом 50 мл, стеклянные палочки, пипетки, бюретки, термостат.

Ход работы. К 10 см³ 5 %-ного раствора желатина с величиной рН от 7,3 до 7,5 приливают 2 см³ испытуемого ферментного раствора и сразу же отбирают 1 см³ реакционной смеси в коническую колбу емкостью от 50 до 100 см³, куда предварительно наливают 20 см³ 96 % этилового спирта и 0,2 см³ 1 % тимолфталеина. Пробу титруют 0,1 н раствором NaOH до появления голубой окраски.

Оставшуюся смесь желатина с ферментным раствором помещают в термостат с температурой 40 °С для гидролиза. Через 3 ч 1 см³ реакционной смеси отбирают во вторую колбу емкостью от 50 до 100 см³, куда предварительно наливают 20 см³ 96 % этилового спирта и 0,2 см³ 1 % тимолфталеина. Пробу титруют, как в случае контрольного варианта.

Расчет протеолитической активности ПС проводят по формуле (13):

$$ПС = \frac{A}{t \times P}, \quad (13)$$

где А – количество аминного азота, накопленного за время опыта из реакционной среды, мл;

t – продолжительность протеолиза, ч;

P – коэффициент, учитывающий разведение и пересчет на 1 г препарата или 1 см³ жидкого ферментного раствора.

Величину А рассчитывают по формуле (14):

$$A = (a - a_k) \times 1,4 \times K, \quad (14)$$

где а – количество 0,1 н раствора NaOH, пошедшее на титрование 1 см³ опытной пробы, см³; а_к – то же для контрольной пробы; К – поправка к титру щелочи; 1,4 – коэффициент пересчета количества 0,1 н раствора щелочи в миллиграммы азота аминокислот и полипептидов.

Контрольные вопросы:

1. Что такое ферменты? Какие классы ферментов известны?
2. Что такое α-амилаза. К какому классу ферментов она относится?
3. При каких условиях α-амилаза наиболее проявляет свою активность?
4. Какие продукты гидролиза получаются при действии α-амилазы на крахмал?
5. В каких процессах принимают участие амилолитические ферменты?
6. Что такое β-амилаза. К какому классу ферментов она относится?
7. Объясните, в чем состоят различия в механизме работы α- и β амилазы.
8. На какие основные группы подразделяют протеазы?
9. Какую пептидную связь в молекуле белка гидролизуют пептидазы?
10. Область применения протеолитических ферментов.
11. На какую пептидную связь воздействуют протеиназы?
12. Способы количественного выражения активности ферментов
13. Фермент-субстратный комплекс
14. Температурный оптимум ферментативной реакции
15. Оптимальное значение рН для ферментов и его биологическое значение.

16. Какие факторы определяют эффективность и специфичность ферментативного катализа.
17. Обратимость действия ферментов.
18. Специфические факторы, повышающие активность ферментов.
19. Гидролазы. Общая характеристика класса.
20. Ферменты в научно-исследовательской работе.
21. Классификация и номенклатура ферментов.
22. Кинетика ферментативной реакции.
23. Изменение ферментативной активности путем ковалентной модификации.

ТЕМА 5. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДОВ

Растительное сырьё и продукты его переработки включают наиболее широкий перечень природных соединений углеводной природы. По числу входящих в состав этих соединений моносахаридных остатков все углеводы подразделяют на моно-, олиго- и полисахариды. Все углеводы являются твердыми, чаще кристаллическими, веществами; большинство моносахаридов и дисахаридов хорошо растворимы в воде и часто выделяются из растворов в виде кристаллогидратов.

Моносахариды – это производные многоатомных спиртов, содержащие карбонильную (альдегидную или кетонную) группу. Когда карбонильная группа находится в конце цепи, моносахарид называют альдозой; при любом другом положении этой группы моносахарид называют кетозой. Важнейшими моносахаридами являются пентозы и гексозы, некоторые из них существуют в природе в огромных количествах в свободном или связанном виде.

К числу наиболее значимых для пищевой промышленности олигосахаридов можно отнести сахарозу, мальтозу и лактозу (дисахариды, группа олигосахаров). Наиболее распространенный запасной полисахарид растений – крахмал. Первичный крахмал образуется из продуктов фотосинтеза в листьях растений и имеет вид мелких крупинок. Образование крахмальных зерен начинается в определенных точках стромы пластиды, называемых образовательными центрами. Рост зерна происходит путем последовательного отложения слоев крахмала вокруг образовательного центра; основным ферментом по образованию и формированию кристаллитов крахмала, является зернообразующая синтаза. По одной из теорий, биосинтез крахмала происходит на поверхности зерен, а молекулы амилозы и амилопектина ориентированы перпендикулярно ей и в противоположных направлениях. Вторичный или запасной крахмал накапливается в лейкопластах (амилопластах) специализированных органов – в корневищах, клубнях, семенах, плодах, образуя простые и сложные зерна.

Крахмал является важнейшим углеводом зерна и зернопродуктов, в муке он содержится в количестве 70–80 %. В растительной клетке крахмал находится в виде кристаллических гранул размерами 0,002–0,15 мкм (рисунки 13, 14).

Форма, размер, строение крахмальных зерен специфичны для каждого вида растений. Поэтому при анализе продовольственного сырья растительного происхождения, в частности муки, по строению крахмальных зерен можно идентифицировать и установить в них наличие примесей.

Крахмальные гранулы-зёрна состоят из амилозы и амилопектина (таблица 10) – полисахаридов, в основе которых лежит глюкоза (97–99 %). **Амилоза** – линейная фракция, образует внутреннюю часть крахмального зерна. **Амилопектин** образует наружную часть крахмального зерна, образован разветвлёнными цепочками остатков глюкозы, соединённых гликозидными связями α -(1→4) и α -(1→6). По структуре молекул амилопектин подобен амилозе, но его цепочки ветвятся чаще, чем у амилозы. Средняя степень полимеризации амило-

зы около 10^3 , но может достигать 10^5 – 10^6 , для амилопектина – более 10^7 . В среднем, длина ответвлений в амилопектине составляет от 20 до 30 глюкозных остатков. Но при этом более компактная молекула амилопектина с общим количеством глюкозных остатков до 100 000 имеет диаметр около 50 нм, а линейная амилоза – 500 нм.

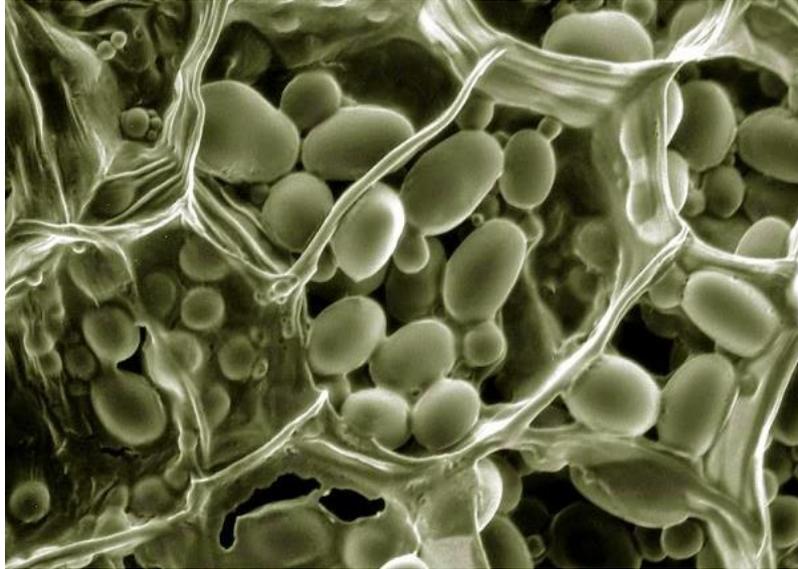


Рисунок 13 – Накопление крахмальных гранул клетками клубней картофеля

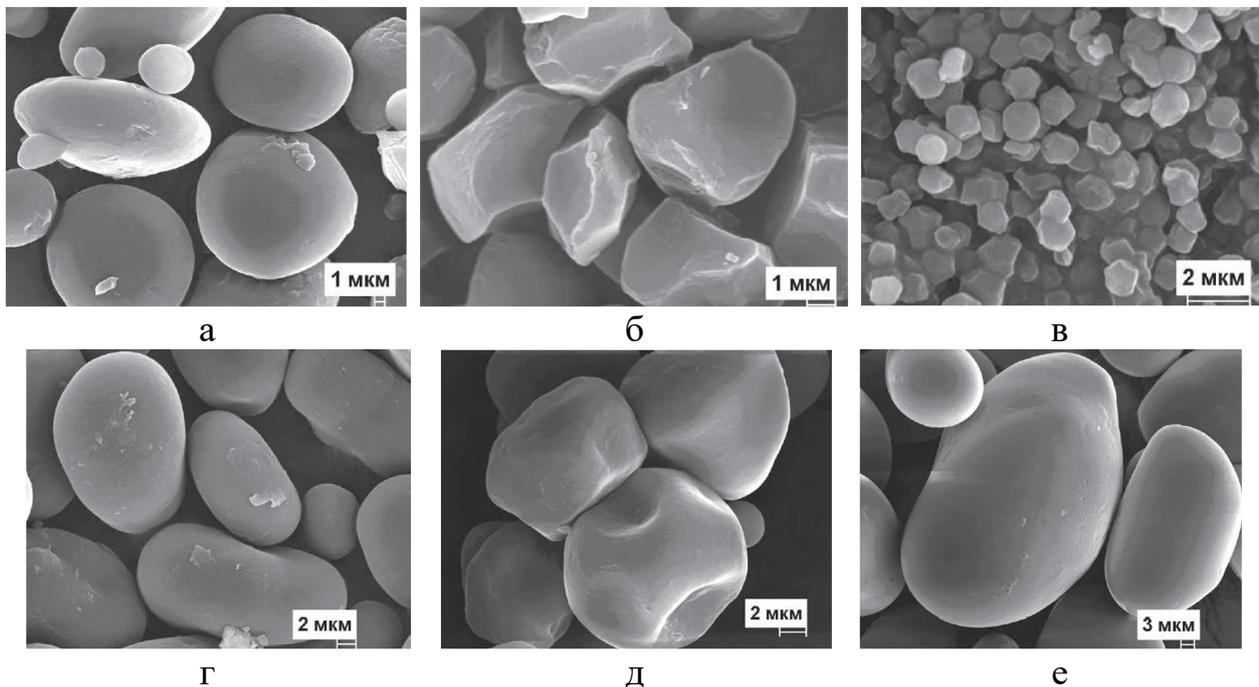


Рисунок 14 – Электронные микрофотографии зерен нативного крахмала: а – пшеничного, б – рисового, в – амарантового, г – нутового, д – кукурузного, е – картофельного [Литвяк и др.]

Таблица 10 – Содержание амилозы в разных видах крахмала

Виды крахмала	Содержание амилозы
Кукурузный	около 20%
Пшеничный	около 20%
Рисовый	около 20%
Картофельный	30%
Амиломаисный крахмал*	80%

*Крахмал крахмалистых (не восковидных) сортов кукурузы.

При увеличении количества амилозы повышается растворимость крахмала в воде, наблюдается более ограниченное набухание, низкая вязкость клейстеров, склонность полисахаридов к ретроградации и быстрому студнеобразованию (таблица 11).

По свойствам, размерам и строению крахмальные зерна ржи, пшеницы и ячменя наиболее сходны между собой по сравнению с другими злаками, наибольший диаметр крахмальных зерен имеет рожь. Так, средний диаметр зерен ржи составляет от 10 до 52 мкм. Особенностью злаковых культур является также характерное распределение нативных крахмальных гранул по размерам, т. е. наличие фракций с крупными (крахмал А) и мелкими (крахмал Б) гранулами. Такое распределение крахмальных зерен влияет на их структуру, термодинамические и функциональные свойства, а также на содержание амилозы в каждой фракции. Так, например, соотношение амилозы и амилопектина в крахмале зерна пшеницы составляет в среднем 1:3, при этом количество амилозы 24–28 %. Мелкие гранулы пшеничного крахмала содержат амилозы 24 %, крупные 25,1 %, гранулы ячменного крахмала – 41,3 % и 24,9 % соответственно.

Таблица 11 – Свойства зерна в зависимости от содержания амилозы и амилопектина

Большое содержание амилозы	Большое содержание амилопектина
<ul style="list-style-type: none"> - при остывании мутный; - образует прочный, густой гель при остывании; - гель становится гуще и выделяет влагу со временем; - не стабилен при размораживании, становится плотнее и покрывается конденсатом; - более плотный в холодном виде, чем в горячем состоянии; придает вкус 	<ul style="list-style-type: none"> - довольно прозрачный раствор; - застывает, но не образует гель; - меньше выделяет влагу со временем; - меньше выделяет влагу при размораживании; - одинаковый по густоте в холодном и горячем виде; - не имеет вкуса

Декстрины являются промежуточными продуктами расщепления крахмала и бывают разного состава и молекулярной массы. Среди них различают амилодекстрины с очень большой молекулярной массой, которые окрашиваются йодом в синий цвет, эритродекстрины с меньшей молекулярной массой, даю-

щие с йодом красновато-бурую окраску; ахродекстрины, имеющие еще меньшую молекулярную массу и не окрашивающиеся йодом и мальтодекстрины со сравнительно низкой молекулярной массой, не окрашивающиеся йодом. Под действием глюкоамилазы декстрины могут осахариваться до глюкозы.

На свойства крахмала в значительной степени влияет содержание в зерне белковых веществ. По сравнению с картофельным крахмалом, где содержание белковых веществ 0,006 %, в зерновых крахмалах их значительно больше, до 0,25–0,5 %. Повышение температуры клейстеризации крахмала и уменьшение вязкости водных дисперсий, объясняется взаимодействием белков с крахмалом, снижением гидратации и степени набухания крахмальных зерен. Белки могут выполнять также экранирующую функцию, повышая устойчивость амилопластов к воздействию ферментов.

Показатель содержания белка в зерне и его качественная характеристика немаловажны при проведении гидролиза, кроме того, имеют значение коллоидные и другие свойства протеинов. Для различных злаковых культур показатель содержания белковых веществ различен. Так, для пшеницы он варьирует в пределах от 9,2 до 25,8 %, для ржи от 9 до 20 % и для ячменя от 7 до 25 %. Следует отметить, что в зернах твердой пшеницы содержание белков больше, чем в зернах мягкой. Также неравномерно распределены белковые вещества и по отдельным тканям зерна пшеницы. Наиболее богат белками алейроновый слой. Много белка и в зародыше. Запасные белки в основном локализованы в эндосперме зерна. В пределах эндосперма белок распределен также неравномерно. Если его периферические слои имеют высокую концентрацию белков, то центральная часть наиболее бедна белками по сравнению со всеми остальными частями зерна. В пределах хозяйственно-ботанического сорта фракционный состав белков меняется в зависимости от крупности зерна: с уменьшением размеров семян увеличивается содержание водо- и солерастворимых белков и снижается содержание спирторастворимых белков.

Азотистые вещества зерна главным образом состоят из нерастворимого в воде белка и содержат небольшое количество растворимых белков. Белковые вещества – самые сложные из всех соединений, содержащихся в зерне. Массовая доля белка в семенах злаков колеблется от 6 до 20 %, в зависимости от культуры зерна, сорта и условий произрастания.

Лабораторная работа №10 «Качественные реакции на моносахариды»

Цель работы: приобрести навыки идентификации, качественного анализа сахаров в пищевом сырье и продуктах питания.

Из числа моносахаридов для проведения многих опытов требуется глюкоза и фруктоза. При отсутствии чистых сахаров обычно можно заменить глюкозу картофельной патокой, а фруктозу – медом, содержащим глюкозу и фруктозу примерно в равных количествах. Инвертный сахар, получаемый при гидролизе сахарозы, также является смесью глюкозы и фруктозы и дает характерные реакции.

В растворах (и пищевых средах) моносахариды находятся преимущественно в форме полуацеталей, на этом и основан качественный анализ.

Для выявления природы углеводов используют качественные реакции, связанные с их полифункциональным характером, наличием карбонильной и гидроксильных групп. Указанные особенности строения обуславливают склонность молекул углеводов к реакциям окисления. На этом свойстве углеводов основано их определение при помощи реактива Фелинга или нитрата серебра – в обоих случаях наблюдается восстановление металла, сопровождающееся более или менее глубоким окислением сахара.

Углеводы особенно чувствительны к окислителям в щелочной среде, которая вызывает ряд изменений молекулы: енолизацию, окислительно-восстановительное диспропорционирование, изомеризацию углеродного скелета и даже его распад. При окислении первичной спиртовой группы трехатомного спирта – глицерола – образуется глицеральдегид (альдоза), а окисление вторичной спиртовой группы приводит к образованию диоксиацетона (кетоза). Не только монозы, но также альдоновые кислоты и полиолы дают некоторые реакции, общие для всего класса сахаров.

Другие аналитические реакции на сахара основаны на способности сахаров конденсироваться с ароматическими системами с образованием окрашенных веществ. Конденсация может происходить за счёт карбонильной группы монозы.

Все сахара, имеющие в окисной форме свободный глюкозидный гидроксил, а в открытой форме – свободную карбонильную группу (т.е. все моносахариды и некоторые дисахариды, например мальтоза), при нагревании в щелочном растворе «осмоляются», подобно альдегидам или кетонам, образуя коричневый или черный раствор. Данный процесс осмоления к образованию сложной смеси веществ; при этом сахар частично изомеризуется по различным направлениям, частично разрушается, давая молочную кислоту и другие соединения. Одновременно идет окисление сахара и получающихся из него веществ, как под действием кислорода воздуха, так и в результате реакции дегидрирования. Продукты осмоления сахаров содержат несколько свободных гидроксильных групп и поэтому, в отличие от альдегидной смолы, хорошо растворимы в воде и особенно в щелочах. При действии разбавленных растворов щелочей сахара не подвергаются столь глубоким изменениям, но все же способны изомеризоваться. Так, глюкоза в этих условиях частично переходит в маннозу и фруктозу.

Проведение качественных реакций

1) Проба «серебряное зеркало»

В пробирку вносят 3 капли 2–3 % раствора AgNO_3 , 5 капель 2 н. NaOH и добавляют по каплям 2,5–4 % NH_4OH до полного растворения осадка, образующегося в начале смешивания растворов. Полученный бесцветный раствор представляет собой аммиачный раствор гидрата окиси серебра.

Затем к аммиачному раствору гидрата окиси серебра добавляют 3–4 капли 5 % раствора мёда и медленно подогревают на спиртовке. В результате ре-

акции идет восстановление глюкозой серебра из аммиачного раствора, на стенках пробирки появляется «серебряное зеркало»*:

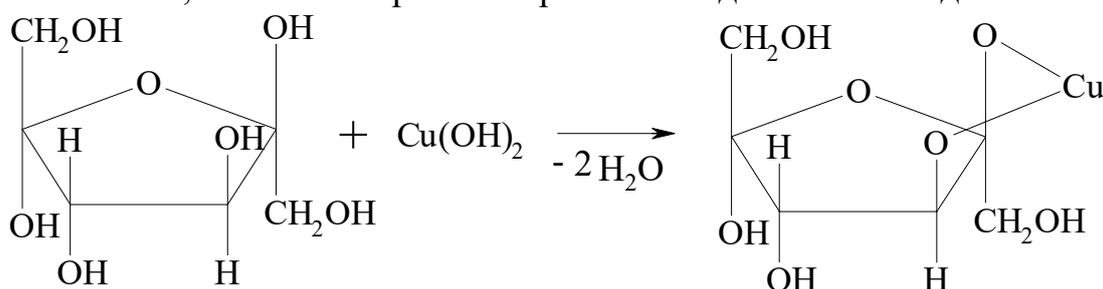


*Если в результате реакции вместо "серебряного зеркала" в пробирке появилась грязно-коричневая взвесь коллоидного серебра, то пробирку следует тщательно обезжирить и промыть, после чего реакцию необходимо повторить.

Аналогичный опыт выполняют с 0,5 % раствором глюкозы или сахарозы**.

2) Качественная реакция с сульфатом меди (реакция Троммера)

В пробирку вносят 1 мл 5 % раствора мёда и 6–8 капель 2 н. раствора NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2 н. раствор CuSO₄ до прекращения растворения реактива. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. При этом голубой, не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди постепенно превращается в жёлтый, затем – в кирпично-красный осадок закиси меди.



Иногда выделяющийся осадок закиси меди сначала имеет желтоватый или зеленоватый цвет, что зависит от размера частиц. Укрупняясь, осадок становится красным, в присутствии некоторых несахаристых примесей – желтым.

Опыт повторяют с 0,5 % раствором глюкозы или раствором сахарозы.

3) Реакция Мура-Геллера

Под влиянием крепкой щелочи (при нагревании) моносахариды быстро расщепляются с образованием органических кислот (молочной, щавелевой и др.). При этом образуются гуминовые вещества неизвестной химической природы. О наличии гуминовых веществ судят по появлению коричневой окраски. Эти же процессы лежат в основе карамелизации сахаров.

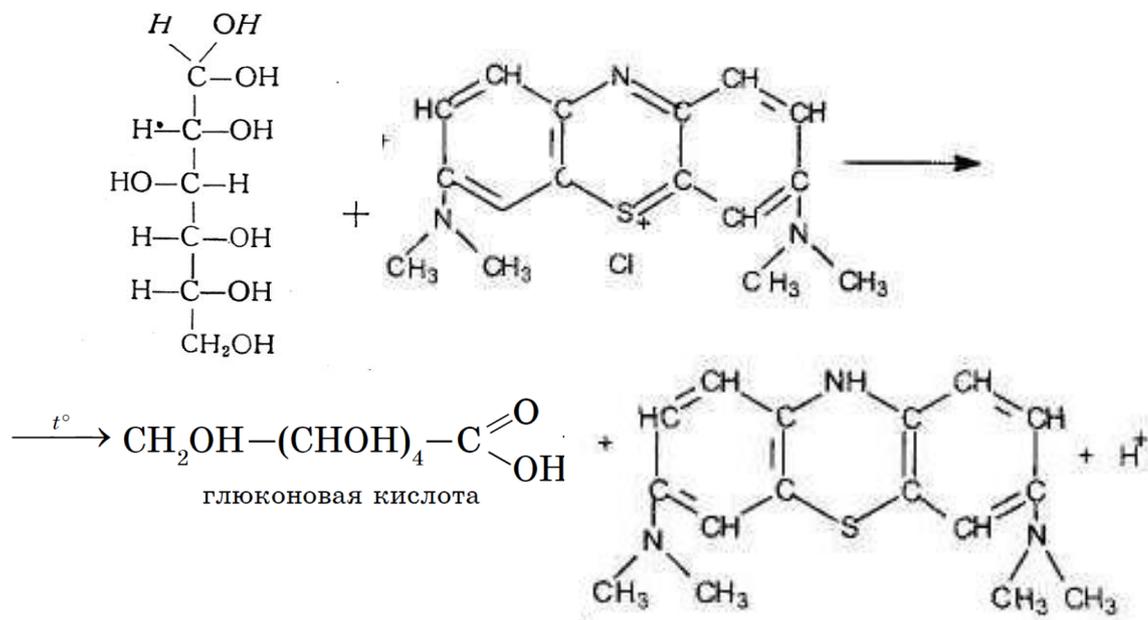
К 2 мл раствора глюкозы прибавляют 10 капель раствора крепкой щелочи и кипятят. Испытуемая смесь желтеет, затем делается бурой и, наконец, темно-бурой и издает запах карамели, заметный особенно при подкислении раствора. На интенсивность появляющейся окраски влияет концентрация сахара, щелочи и длительность нагрева. Опыт повторяют с 0,5 % раствором фруктозы и раствором сахарозы.

**Сахарозу предварительно подвергают гидролизу кипячением раствора сахарозы в присутствии минеральных кислот (0,5 мл 10 % раствора серной или азотной кислоты в расчете на 5 г сахара) в течение 15–20 минут.

4) Реакция глюкозы с метиленовым синим

В щелочной среде метиленовый синий окисляет (путем дегидрирования) гидратную форму моносахарида до монокарбоновой кислоты. При этом мети-

леновый синий (синего цвета I) восстанавливается до лейкометиленовой сини (бесцветное соединение II):



Гидратная форма сахаров обычно образуется в водной среде при наличии альдегидной формы сахара. При этом альдегидная форма сахара присоединяет к себе молекулу воды.

К 2 мл раствора глюкозы прибавляют 5 капель 10% раствора щелочи и 2 капли 0,1% водного раствора метиленового синего. Жидкость нагревают до обесцвечивания и охлаждают.

При встряхивании синяя окраска появляется вновь. Появление синей окраски объясняется тем, что соединение метиленового синего с водородом (лейкометиленовая синь II) непрочно в присутствии кислорода (непрочность объясняется большим сродством водорода к кислороду, чем к метиленовому синему). В результате, в присутствии кислорода происходит окисление метиленового синего также путем дегидрирования.

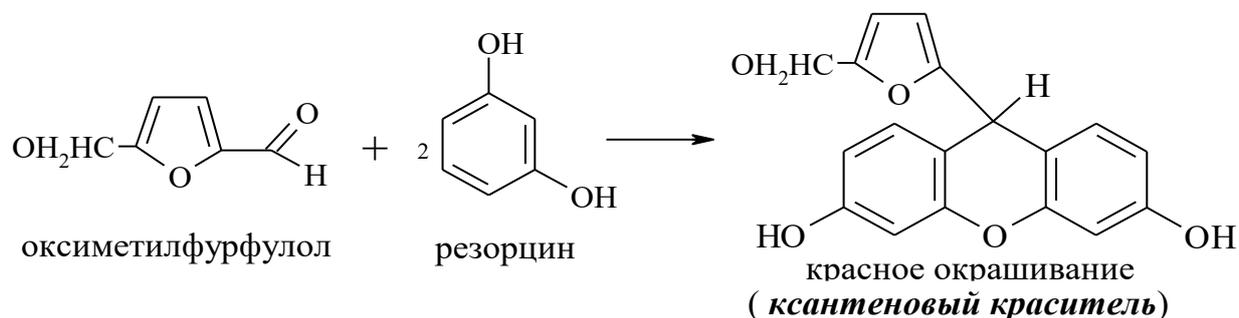
Общее значение всей суммы химических реакций заключается в том, что глюкоза окислилась до глюконовой кислоты за счет кислорода гидроксила воды, а кислород воздуха окислил водород воды при обязательном участии метиленового синего в качестве передатчика водорода к кислороду.

5) Качественное определение фруктозы. Реакция Селиванова на кетогексозы

В первую пробирку вносят 1 мл 5 % раствора мёда, во вторую – 1 мл 0,5 % раствора фруктозы, в третью пробирку – 1 мл 0,5 % раствора глюкозы. В каждую пробирку добавляют по 1 мл свежеприготовленного реактива Селиванова (0,05 % раствор резорцина в 20 % соляной кислоте). Осторожно нагревают полученную смесь в пламени спиртовки.

В пробирках с мёдом и фруктозой на первой стадии образуется оксиметилфурфурол, который, конденсируясь во второй стадии с резорцином, даёт постепенно проявляющееся вишнево-красное окрашивание.

В пробирке с глюкозой такого окрашивания не будет.



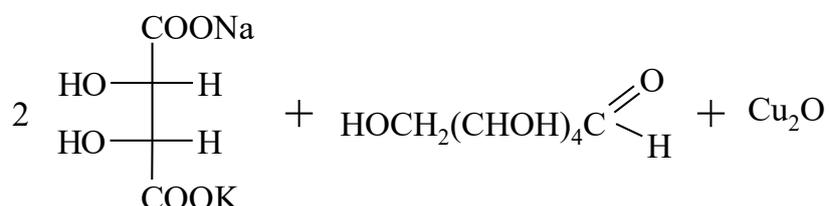
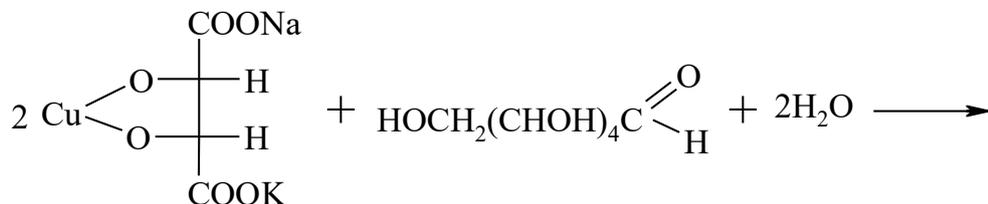
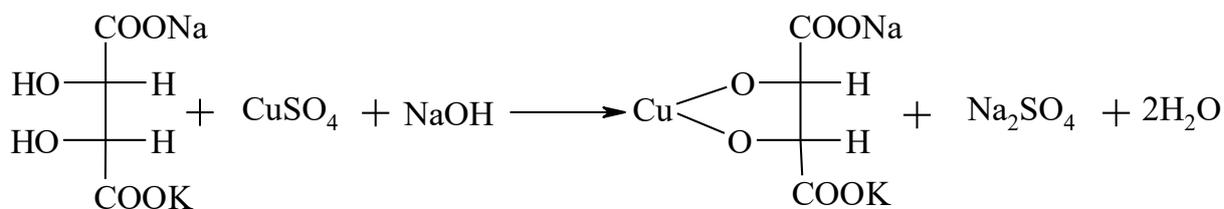
Результаты, полученные в процессе выполнения лабораторной работы, оформляют в тетради в произвольной форме.

Лабораторная работа №11 «Определение глюкозы реакцией восстановления оксида меди в гемиоксид»

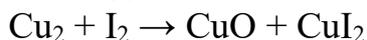
Цель работы – научиться определять глюкозу методом восстановления оксида меди (II) в гемиоксид, что является классическим качественным и полуколичественным тестом на редуцирующие сахара.

В основе метода лежит способность солей меди (II) в определенных условиях количественно окислять глюкозу по реакции Троммера.

В реакции Троммера происходит образование как альдоновых кислот, так и гидроксида меди (II), что указывает на отсутствие количественной связи между глюкозой и гемиоксидом меди. Однако если к реакционной смеси добавляют сегнетову соль, то образуется комплекс, в котором медь реагирует с глюкозой в стехиометрическом соотношении:

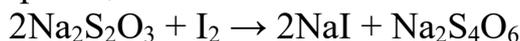


Количество закиси меди (Cu_2O), эквивалентное окисленной глюкозе, определяют йодометрическим методом:



Эта реакция в присутствии солей щавелевой или винной кислот протекает практически до конца.

Количество йода в излишке, которое не прореагировало с гемиоксидом меди, можно определить титрованием тиосульфатом натрия (индикатор – раствор крахмала) согласно реакции:



Материалы и реактивы: исследуемый раствор глюкозы (1–4 мг/мл), реактив Фелинга I и II (для приготовления раствора I берут 200 г сегнетовой соли и 150 г гидроксида натрия, растворяют в дистиллированной воде до объема 1 литр; раствор II готовят из 40 г перекристаллизованного сульфата меди, растворенного в 1 литре воды), насыщенный раствор щавелевой кислоты, 0,05 М раствор йода, 0,05 М раствор тиосульфата натрия, 1 % раствор крахмала.

Оборудование: стеклянные палочки, пипетки, конические колбы (объем 50 мл), капельницы, водяная баня, бюретки, часы.

Ход работы. В две колбы помещают по 5 мл реактива Фелинга I и II. В одну из колб (проба) добавляют 10 мл исследуемого раствора глюкозы, а в другую (контроль) – 10 мл дистиллированной воды. Содержимое обеих колб нагревают до кипения, кипятят 5 мин и затем охлаждают. После этого в обе колбы наливают по 10 мл насыщенного раствора щавелевой кислоты, по 10 мл йода и после перемешивания отстаивают в течение 5 мин. По истечении этого времени в колбы вносят по пять капель раствора крахмала и титруют раствором тиосульфата до исчезновения окраски, образовавшейся после добавления крахмала.

Массовую концентрацию глюкозы в исследуемом растворе (мг/мл) рассчитывают по формуле (16):

$$C = (B - A) \times f \times Q \times \frac{V_0}{V_1}, \quad (18)$$

где А и В – объемы раствора тиосульфата натрия, затраченные на титрование пробы и контроля соответственно;

f – коэффициент поправки на титр 0,05 моль/л раствора тиосульфата натрия;

Q – масса глюкозы (3,52 мг), эквивалентная 1 мл 0,05 моль/л раствора тиосульфата натрия;

V₀ – общий объем пробы;

V₁ – объем исследуемого раствора, взятый до анализа.

Лабораторная работа № 12 «Определение восстанавливающих сахаров в зерне и зернопродуктах по методу Бертрана»

Цель работы: закрепление и углубление знаний по теме «Углеводы», освоение методики определения содержания восстанавливающих сахаров в зерне и зернопродуктах по методу Бертрана.

В зерне и продуктах его переработки содержатся моносахариды, дисахариды, другие простые углеводы. Некоторые из них обладают редуцирующей (восстанавливающей) способностью. Эти сахара в своем составе имеют гидроксил, обладающий повышенной реакционной способностью. Он образуется из альдегидной или кетонной группы при образовании циклической формы сахаров и называется гликозидным или полуацетальным и принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях.

Восстанавливающие сахара можно определить методом Бертрана, в основе которого лежит способность восстанавливающих сахаров в щелочной среде восстанавливать сернокислую медь до закиси меди или до свободной меди (ион двухвалентной меди восстанавливается до одновалентного):



Таким методом можно определять содержание в зерне и продуктах его переработки глюкозы, фруктозы, мальтозы. Содержание сахарозы определяется, если предварительно ее гидролизовать, например, кислотой, до моносахаридов (глюкозы и фруктозы – инвертный сахар) и определять далее содержание инвертного сахара. Но при этом необходимо учитывать содержание природных восстанавливающих сахаров.

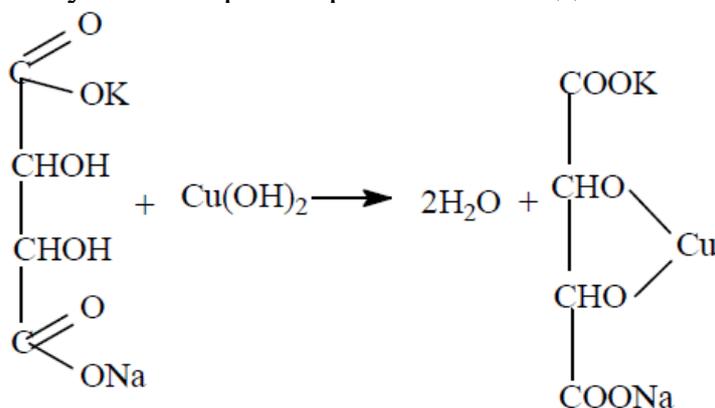
Проведение анализа

На лабораторных весах берут навеску размолотого зерна 10,0 г, пересыпают ее в фарфоровую ступку и пипеткой добавляют реактив Барнштейна (15 см³ 6 % раствора сернокислой меди и 15 см³ 1,25 % раствора едкого натрия). Тщательно растирают полученную смесь пестиком до образования однородной массы. При этом происходит следующая химическая реакция:



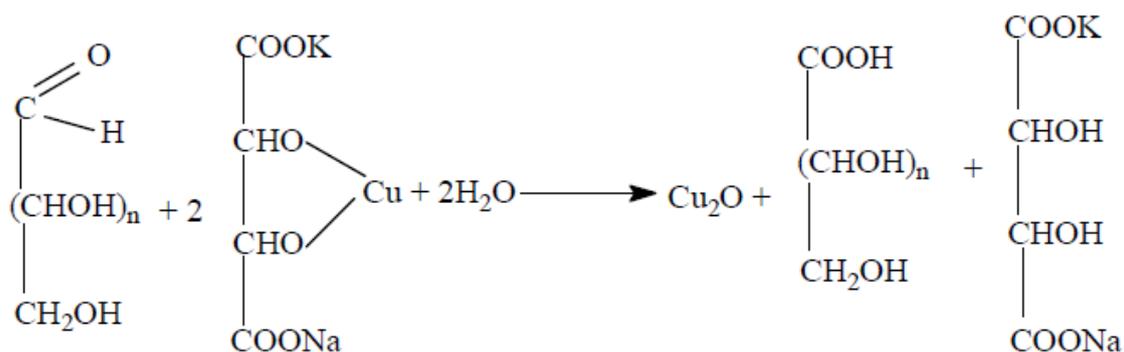
При добавлении этих реактивов происходит так же инактивация ферментов и осаждение белков зерна, которые могут повлиять на результаты определения.

В ступку добавляют 70 см³ дистиллированной воды, обмывая при этом пестик. Для лучшего растворения сахаров и полного осаждения белков ступку ставят в термостат на 30 минут при температуре от 45 °С до 50 °С. По истечении этого времени ступку достают из термостата, и содержимое фильтруют через бумажный складчатый фильтр в сухую коническую колбу с широким горлышком. Первые мутные порции фильтрата возвращают на фильтр. По окончании фильтрования пипеткой отбирают 20 см³ фильтрата, переносят в сухую коническую термостойкую колбочку и добавляют в нее по 20 см³, взятых пипеткой, растворов Фелинга I и II. При добавлении этих растворов происходит следующее. Нерастворимое основание Cu(OH)₂ взаимодействует с раствором Фелинга II, связывая медь и удерживая ее в растворе в виде комплексного соединения. Цвет полученного раствора в колбочке должен быть ярко синим.



Раствор в конической колбе нагревают на плитке до кипения и кипятят ровно 3 минуты (время фиксируют по песочным часам). Кипение жидкости должно протекать спокойно, жидкость в колбе должна оставаться синего цвета, что указывает на избыток реактивов Фелинга, а, следовательно, на полное окисление сахаров. Если раствор изменяет свой цвет, становится более светлым, это означает, что в нем содержится много сахаров и добавленного количества растворов Фелинга недостаточно для полного их окисления. В этом случае необходимо взять другую порцию фильтрата и добавлять большее количество растворов Фелинга.

При кипячении фильтрата растворенные в нем сахара вступают во взаимодействие с комплексным соединением меди с образованием осадка закиси меди Cu₂O, сахар окисляется до соответствующей кислоты и вновь образуется сегнетовая соль.



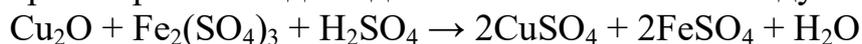
После 3-минутного кипения колбу снимают с плитки и ставят на охлаждение, при этом оседает хорошо заметный красный осадок закиси меди. Жидкость над осадком должна оставаться ярко синего цвета.

Синюю жидкость далее фильтруют через асбестовый фильтр в колбу Бунзена, соединенную с отсасывающим насосом. На асбестовый фильтр кладут вырезанный кружок из бумажного фильтра. Осадок закиси меди должен оставаться в колбе, где он образовался, но некоторая его часть может перейти на фильтр. Осадок в колбе и на фильтре несколько раз промывают горячей водой, отсасывая жидкость в ту же колбу Бунзена. Небольшой слой горячей воды должен постоянно покрывать осадок в колбе и на фильтре, чтобы он не окислялся кислородом воздуха. Промывание осадка горячей водой продолжают до тех пор, пока промывные воды станут бесцветными.

После промывания водой, под фильтр ставят чистую колбу Бунзена (или освобождают первую колбу, промывая ее несколько раз горячей водой), а к промытому осадку в колбе приливают 10–15 см³ раствора сернокислого железа, осадок при этом растворяется.

Полученный раствор постепенно переливают на асбестовый фильтр так, чтобы находящийся на нем осадок тоже растворился. Колбочку, где был осадок, несколько раз промывают горячей водой, сливая ее на асбестовый фильтр.

Процесс растворения осадка идет в соответствии со следующей реакцией:



При этом закись меди окисляется до CuSO_4 окисным железом, а железо восстанавливается до закисного – FeSO_4 ; причем количество образовавшегося сернокислого железа закисного эквивалентно количеству окислившейся меди.

Зеленоватый раствор из колбы Бунзена переносят в сухую коническую колбу и титруют раствором перманганата калия до появления розового окрашивания (от последней капли), которое не исчезает в течение одной минуты.

При титровании происходит следующая реакция:



Сернокислое железо закисное количественно окисляется перманганатом калия до сернокислого железа окисного, а перманганат калия при этом восстанавливается до сернокислого марганца и сернокислого калия.

Обработка результатов. По количеству израсходованного перманганата калия по таблице 12 или 13 определяют количество сахара во взятой навеске зерна или зернопродукта. Титр перманганата по меди принимается равным 6,36.

Таблица 12 – Определение сахара (глюкозы) по меди (микрометод В.С. Ильина)

Сахар, мг	Медь, мг	Сахар, мг	Медь, мг	Сахар, мг	Медь, мг	Сахар, мг	Медь, мг
1	1,3	12	15,3	23	29,1	34	42,6
2	2,6	13	16,6	24	30,4	35	43,9
3	3,9	14	17,9	25	31,6	36	45,1
4	5,2	15	19,1	26	32,8	37	46,3
5	6,4	16	20,4	27	34,0	38	47,5
6	7,7	17	21,6	28	35,3	39	48,5
7	9,0	18	22,9	29	36,6	40	49,9
8	10,3	19	24,2	30	37,8	41	51,1
9	11,5	20	25,4	31	39,0	42	52,3
10	12,8	21	26,6	32	40,2	43	53,5
11	14,1	22	27,9	33	41,4	44	54,7

Таблица 13 – Определение сахара (мальтозы) по меди

Сахар, мг	Медь, мг	Сахар, мг	Медь, мг	Сахар, мг	Медь, мг	Сахар, мг	Медь, мг
10	11,2	33	36,5	56	61,4	79	86,1
11	12,3	34	37,6	57	62,5	80	87,2
12	13,4	35	38,7	58	63,5	81	88,3
13	14,5	36	39,8	59	64,6	82	89,4
14	15,6	37	40,9	60	65,7	83	90,4
15	16,7	38	41,9	61	66,8	84	91,5
16	17,8	39	43,0	62	67,9	85	92,6
17	18,9	40	44,1	63	68,9	86	93,7
18	20,0	41	45,2	64	70,0	87	94,8
19	21,1	42	46,3	65	71,1	88	95,8
20	22,2	43	47,4	66	72,2	89	96,8
21	23,3	44	48,5	67	73,3	90	98,0
22	24,4	45	49,5	68	74,3	91	99,0
23	25,5	46	50,6	69	75,4	92	100,1
24	26,6	47	51,7	70	76,5	93	101,1
25	27,7	48	52,8	71	77,6	94	102,3
26	28,9	49	53,9	72	78,6	95	103,2
27	30,0	50	55,0	73	79,9	96	104,2
28	31,1	51	56,1	74	80,8	97	105,3
29	32,2	52	57,1	75	81,8	98	106,3
30	33,3	53	58,2	76	82,9	99	107,4
31	34,4	54	59,3	77	84,0	100	108,4
32	35,5	55	60,3	78	85,1	102	–

Пример расчета. На титрование израсходовано 3,4 мл KMnO_4 , что соответствует $6,36 \cdot 3,4 = 21,6$ мг меди. В таблице 5, в графе «медь» нет величины 21,6, но есть 20,4 и 22,4 мг. меди. Величине 22,4 мг меди соответствует 11 мг сахара, следовательно, $22,4 - 20,4 = 2$ мг меди соответствует 1 мг сахара. Так как рассчитанная нами величина 21,6 мг меди находится между имеющимися значениями в таблице, то вычисляем разницу: $22,4 - 21,6 = 0,8$ мг меди.

Составляем пропорцию: 2 мг меди соответствует 1 мг сахара
0,8 мг меди соответствует X мг сахара

Из данной пропорции находим X: $X = (0,8 \cdot 1) : 2 = 0,4$ мг сахара.

Если 22,4 мг меди соответствует 11 мг сахара, то 21,6 мг меди соответствует: $11,0 - 0,4 = 10,6$ мг сахара. Поскольку для определения сахара был взят объем фильтрата 20 см^3 , из общего объема 100 см^3 , следовательно, окончательный результат необходимо умножить на 5:

$$10,6 \cdot 5 = 53 \text{ мг сахара.}$$

Далее необходимо рассчитать содержание сахара во взятом образце размолотого зерна в процентах на сухое вещество (рассчитать самостоятельно).

В заключение необходимо сравнить полученные данные по содержанию восстанавливающих сахаров с аналогичными данными из литературных источников.

Лабораторная работа №13 «Определение массовой доли крахмала в зерне и зернопродуктах»

Цель работы: закрепление и углубление знаний по теме «Углеводы», приобретение практических навыков работы с поляриметром, освоение методики определения массовой доли крахмала (далее содержания крахмала) в зерне и зернопродуктах.

Крахмал в воде не растворяется, не обладает оптической активностью. Если подвергнуть крахмал не полному кислотному гидролизу, то можно получить промежуточные продукты гидролиза – декстрины, различной молекулярной массы, которые способны поворачивать плоскость поляризации луча света на какой-то угол, то есть получить оптически активные вещества. Величина угла зависит от концентрации образовавшихся декстринов, а, следовательно, и от количества крахмала. Поэтому для определения содержания крахмала можно использовать поляриметры (сахариметры).

В злаковых культурах крахмал содержится в больших количествах. Так, в зерне пшеницы, ржи, овса, проса, гречихи, кукурузы содержание крахмала составляет от 60 % до 75 %, в ячмене – от 50 % до 60 %. В бобовых культурах содержание крахмала меньше, чем в злаковых, так, например, в горохе – 34 %, а в сое только 3 %. Больше всего крахмала содержится в зерне риса от 75 % до 80 %. В эндосперме пшеницы больше крахмала содержится в центральных частях и меньше в слоях эндосперма, прилегающих к оболочкам зерна. При размолу пшеницы в муку большее количество крахмала попадает в высший сорт и меньше во второй сорт. Например, в среднем содержание крахмала в муке

высшего сорта составляет 68,7 %, первого – 67,1 %, второго – 62,8 %, обойной – 55,8%.

Содержание крахмала в зерне и муке определяется в соответствии с ГОСТ 10845–98 «Зерно и продукты его переработки. Метод определения крахмала». Сущность метода заключается в том, что крахмал способен, в присутствии разбавленной соляной кислоты, давать растворы, обладающие оптической активностью и поворачивающие плоскость поляризации луча света, пропускаемого через раствор, на какой-либо угол.

Проведение анализа

Реактивы, аппаратура: мельница лабораторная; весы лабораторные с допускаемой погрешностью взвешивания $\pm 0,01$ г; сито из сетки тканой № 08; сахариметр универсальный СУ-5; плитка электрическая нагревательная; баня водяная; термометр стеклянный, колбы мерные вместимостью 100 см³; колбы конические вместимостью 100 см³; воронки лабораторные; часы с секундной стрелкой; пипетки вместимостью 5,10 и 25 см³; бумага фильтровальная; кислота соляная, раствор с массовой долей 1,124%; аммоний молибденовокислый раствор с массовой долей 10,0 %; или натрий молибденовокислый раствор с массовой долей 15,0 %; кислота фосфорно-вольфрамовая, раствор с массовой долей 4,0 %; эфир этиловый; вода дистиллированная.

Для определения содержания крахмала из средней пробы зерна или хлебопродуктов выделяется 50 г при помощи делителя или вручную. Из зерна или крупы удаляется сорная примесь, за исключением испорченных зерен или ядер.

Очищенную навеску размалывают на лабораторной мельнице так, чтобы весь размолотый продукт прошел при просеивании через сито № 08.

Определение содержания крахмала ведется в двух параллельных навесках. Одновременно с определением крахмала необходимо определять влажность исследуемого материала, так же в двух повторностях.

Из измельченного и тщательно перемешанного материала взвешивают на лабораторных весах две навески массой по 5,0 г, через воронку пересыпают в мерные колбы вместимостью 100 см³.

В колбу с навеской приливают 25 см³ раствора соляной кислоты и осторожно перемешивают содержимое колбы, чтобы смочить весь продукт и не допустить образования комочков. Затем, смывая частицы продукта со стенок колбы, приливают еще 25 см³ раствора соляной кислоты. Мерную колбу, погружают в кипящую водяную баню, вода должна покрывать содержимое колбы и непрерывно кипеть. В течение трех минут, после погружения колбы в водяную баню, ее содержимое постоянно перемешивают, чтобы обеспечить равномерный нагрев и не допустить клейстеризации крахмала. Затем колбу оставляют в кипящей водяной бане еще на 12 минут. Под действием соляной кислоты происходит кислотный гидролиз крахмала до промежуточных продуктов – декстринов. Общее время гидролиза должно быть точно 15 минут. Затем колбу вынимают из водяной бани и приливают 20 см³ холодной дистиллированной воды, все перемешивают и охлаждают под струей воды из водопровода до температуры $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Белок, содержащийся в продукте, может повлиять на величину угла поворота поляризованного луча света, а также сделать раствор мутным, с которым невозможно работать на сахариметре. Для окончательного и полного осаждения белка к содержимому колбы приливают 5 см³ 4,0 %-ного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (или 5 см³ 10,0 %-ного раствора молибденовокислого аммония или 3 см³ 15,0 %-ного раствора молибденовокислого натрия). Если после добавления осадителей появляется пена, ее нужно погасить одной, двумя каплями этилового эфира. Объем раствора в колбе доводят до метки на горлышке колбы дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр в сухую колбу. Первые капли фильтрата могут быть мутными, их возвращают на фильтр. Профильтрованный раствор должен быть прозрачным, он может быть бесцветным либо слегка окрашенным. Если фильтрат получается мутным, необходимо повторить фильтрование через новый фильтр.

Перед началом работы на сахариметре необходимо проверить совпадение нулевых значений на шкале и нониусе прибора. Для этого закрывают крышку сахариметра, не помещая в него поляриметрическую трубку, и уравнивают яркость полей сравнения, вращая рукоятку сахариметра. Затем с помощью юстировочного ключа совмещают нулевое деление нониуса с нулевым делением шкалы. Трубку сахариметра ополаскивают дистиллированной водой, а потом небольшим количеством своего раствора, который выливают. Затем заполняют трубку испытуемым раствором полностью так, чтобы был выпуклый мениск, закрывают покровным стеклом, не допуская образования пузырька воздуха. Трубку хорошо протирают фильтровальной бумагой и кладут в желоб сахариметра. Закрывают крышку прибора и поляризуют раствор, добиваясь равномерной окраски полей сравнения, вращая рукоятку сахариметра по часовой или против часовой стрелки. Снимают показание шкалы – угол α .

Определение угла проводят в трех разных порциях фильтрата, взятых из одной колбы. Если расхождение между значениями угла α превышают 0,1 градуса шкалы, то продолжают работу со следующими порциями фильтрата, до тех пор, пока расхождение между крайними значениями любых трех определений не будут превышать 0,1 градуса шкалы прибора. В этом случае для расчета берут среднее арифметическое значение трех отсчетов.

Обработка результатов. Содержание крахмала X , в процентах, в пересчете на сухое вещество, определяют по формулам (17, 18):

$$X = \frac{a K 100}{0,3468(100 - W)} \quad \text{– при использовании поляриметра с круговой шкалой (17);}$$

$$X = \frac{a K 100}{100 - W} \quad \text{– при использовании сахариметра с нормальной шкалой (18).}$$

где α – показание поляриметра (сахариметра), градус шкалы;

W – влажность зерна, муки или крупы, %;

K – переводной коэффициент для зерна и продуктов его переработки, соответственно равен: для пшеницы – 1,898; ржи – 1,885; ячменя – 1,912; овса –

1,914; проса – 1,818; кукурузы – 1,879; гречихи – 1,805; вики, гороха, чечевицы – 1,747.

Переводные коэффициенты рассчитываются для трубки длиной 200 мм. Если при определении угла использовалась трубка сахариметра длиной 100 мм, окончательный результат, рассчитанный по формуле, необходимо умножить на 2. Расчеты ведут до второго десятичного знака. Допустимое расхождение между результатами при параллельных определениях крахмала в муке не должно превышать $(0,641 + 0,008 \cdot X_{\text{ср}})$ %, а в зерне не должно превышать 0,5 % при длине трубки 200 мм и 1,0 % – при длине трубки 100 мм. Если это условие выполняется, то за окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

В заключение необходимо сравнить полученные результаты по количеству крахмала в испытуемом образце с аналогичными данными из литературных источников.

Контрольные вопросы

- 1) Что такое крахмал?
- 2) В чем состоит метода определения крахмала поляриметрическим методом?
- 3) Почему для определения содержания крахмала можно использовать сахариметр?
- 4) Как проводится кислотный гидролиз крахмала?
- 5) Какие вещества образуются при кислотном гидролизе крахмала?
- 6) Каково должно быть общее время кислотного гидролиза крахмала?
- 7) Почему необходимо провести осаждение белка, содержащегося в продукте?
- 8) Чем можно провести осаждение белка?
- 9) Как настраивается сахариметр перед работой?
- 10) Сколько раз нужно измерять угол для получения достоверных результатов?
- 11) Укажите расхождение между крайними значениями угла α ?
- 12) Допустимое расхождение между результатами при параллельных определениях крахмала в муке?
- 13) В какой анатомической части зерновки содержится больше крахмала?
- 14) В каких анатомических частях зерновки крахмал не содержится?

ТЕМА 6. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЗЕРНА И МУКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ЗОЛЫ

Минеральные вещества зерна представлены неорганическими соединениями (солями) и некоторыми элементами, которые входят в состав сложных органических веществ (фосфатидов, фитина, белков) и только при сжигании и прокаливании продукта превращаются в неорганические соединения (золу).

Общее содержание минеральных веществ в зерне (зольность зерна) невелико. В зерне пшеницы и ржи их около 2 %, в зерне бобовых – 3–4 % и в зерне пленчатых культур – до 4–5 %.

Элементарный состав минеральных веществ зерна разнообразен. В зерне находятся макроэлементы – фосфор, калий, кальций, магний, натрий, железо, а в зерне пленчатых культур значительное содержание соединений кремния. Также разнообразен состав микроэлементов зерна. В него входят соединения марганца, меди, цинка, мышьяка и других элементов.

Минеральные вещества муки в основном сосредоточены в алейроновом слое, оболочках и зародыше. Содержание минеральных веществ в эндосперме невелико (0,3–0,5%) и повышается от центра к периферии, поэтому зольность служит показателем сорта муки.

Большая часть минеральных веществ муки состоит из соединений фосфора (50%), а также калия (30%), магния и кальция (15%). В небольших количествах содержатся микроэлементы (медь, марганец и цинк). Содержание железа в золе разных сортов муки 0,18–0,26%. Чем выше сорт муки, тем меньше в ней находится минеральных веществ.

Лабораторная работа №14 «Определение массовой доли золы в зерне и муке»

Цель работы: углубление и закрепление знаний по теме: «Минеральные вещества и вода в зерне», приобретение практических навыков по определению массовой доли золы (далее зольности) зерна или муки.

Зерно и продукты его переработки являются одним из основных источников минеральных веществ для организма человека. Зерно, высушенное, не содержащее влагу, состоит из элементов двух групп. На долю первой группы (С, О, Н, N, S, P), приходится от 95% до 98,5%. Остальную часть сухих веществ от 1,5 % до 5 % составляют другие элементы.

Содержание минеральных веществ определяют, сжигая навеску зерна или продуктов его переработки в специальных муфельных печах при температуре от 650 °С до 850 °С. После сжигания продукта остается зола. Масса золы, выраженная в процентах к исходной массе навески, называется зольностью. При сжигании элементы природных органических веществ (углерод, водород, азот и частично кислород) окисляются и переходят в углекислый газ и другие газы, пары воды, которые улетучиваются.

В виде золы остаются нелетучие оксиды химических элементов: Са, Mg , Si, Al, Fe, P, К, Na и других. В золе пшеницы и ржи и других злаковых культур

преобладают оксиды фосфора, калия и магния. На оксид фосфора приходится около 50% всей золы, на оксид калия – около 30 % и на оксид магния – около 10 %. В пленчатых культурах резко возрастает доля оксида кремния, в золе бобовых оксида фосфора содержится меньше, чем в злаковых культурах, но доля оксида железа возрастает примерно вдвое.

В золе семян подсолнечника много не только оксида фосфора, но и оксида калия, магния, кальция. Если все минеральные вещества зерна пшеницы принять за 100 %, то около 25 % их находится в эндосперме, около 10 % – в зародыше со щитком и более 60 % – в оболочках с алейроновым слоем. В самом эндосперме золообразующие элементы распределены так же неравномерно. Если внутренние слои имеют зольность от 0,37 % до 0,58 %, то в слое, прилегающем к алейроновому слою, она достигает 1,01–1,87 %.

Зольность сортовой муки зависит от того, в какой мере в нее входят периферийные части эндосперма и оболочки. Стандартами установлены нормы зольности для каждого сорта муки. Если зольность муки выше нормы, то мука считается нестандартной, необходимо перестраивать режимы переработки зерна. Пшеничная мука сорта экстра должна иметь зольность не более 0,45 %, высшего сорта – не более 0,55 %, мука первого сорта – не более 0,75 %, мука второго сорта – не более 1,25 %, обойная мука должна иметь зольность не менее чем на 0,07 % ниже зольности зерна до его очистки, но не более 2,00 %.

Зольность регламентируется так же для ржаной муки и некоторых круп. Зольность зерна определяют по ГОСТ 10847–74 «Зерно. Методы определения зольности». Зольность муки и отрубей определяют по ГОСТ 27494–87 «Мука и отруби. Методы определения зольности». Одновременно с определением зольности необходимо проводить определение влажности испытуемых образцов, так как расчет зольности ведется на сухое вещество.

Испытуемый материал: зерно, мука, крупа.

Проведение анализа

Аппаратура и реактивы: весы лабораторные с допускаемой погрешностью взвешивания $\pm 0,01$ г и $\pm 0,0001$ г; мельница лабораторная, сито № 08; стеклянные пластинки размером 20×20 см; печь муфельная; эксикатор; тигли фарфоровые № 3; щипцы тигельные; бумага фильтровальная лабораторная; воронка стеклянная; пипетка на 5 см³; колба мерная вместимостью 100 см³; кислота азотная плотностью 1,2 г/см³; спиртовой раствор уксуснокислого магния (1,61 г (СН₃СОО)₂Мg растворяют в 100 см³ 96 % чистого этилового спирта).

В полученный раствор добавляют один, два кристаллика йода, после растворения которых раствор фильтруют через бумажный фильтр). Перед определением зольности необходимо подготовить фарфоровые тигли к работе. Их помещают на 2 часа в 50 % раствор соляной кислоты для того, чтобы удалить все остатки от предыдущих определений. Затем промывают в растворе соляной кислоты и воде и просушивают 2 часа в сушильном шкафу при температуре от 100 °С до 150 °С, если тигли новые, то их после промывания нумеруют (номер лучше наносить на боковую сторону тигля раствором хлорного железа) и прокаливают в муфельной печи до постоянной массы.

При определении зольности зерна из средней пробы выделяют навеску массой 30 г, очищают ее от сорной примеси, за исключением испорченных зерен, и размалывают на лабораторной мельнице так, чтобы весь размолотый продукт прошел через сито из металлотканой сетки № 08. Весь размолотый продукт рассыпают ровным, тонким слоем на стеклянной пластинке и накрывают сверху другой пластинкой так, чтобы слой продукта получился толщиной 3-4 мм. Убрав верхнее стекло, из разных мест берут не менее 10 проб так, чтобы масса общей навески была около 2,0 г, далее ведут определение зольности по одному из методов, описанных ниже.

Сущность всех методов определения зольности заключается в сжигании навески размолотого зерна или муки в муфельной печи с последующим взвешиванием массы оставшейся золы. Сжигание навесок может производиться без ускорителя или с ускорителем процесса сжигания. В качестве ускорителя применяется азотная кислота или спиртовой раствор уксуснокислого магния. Азотная кислота является сильным окислителем и поэтому способствует более быстрому окислению минеральных веществ зерна и продуктов его переработки. Спиртовой раствор уксуснокислого магния разрыхляет навеску продукта, способствуя тем самым более быстрому окислению и сжиганию продукта при высокой температуре.

Основной метод озоления (без применения ускорителей). На весах с погрешностью взвешивания $\pm 0,1$ г взвешивают фарфоровый тигель и берут навеску размолотого зерна или муки массой около 2,0 г. Уточняют массу тигля на аналитических весах с погрешностью взвешивания $\pm 0,0001$ г, переносят в него навеску и вновь уточняют массу тигля с навеской на аналитических весах (делают в двух-трех повторностях). Взвешенные тигли с навесками помещают у дверцы муфельной печи, нагретой от 400 °С до 500 °С (темно-красное каление) и обугливают навески, не допуская воспламенения. После прекращения выделения продуктов сухой перегонки (дыма) тигли задвигают в муфельную печь, закрывают дверцу и нагревают печь от 600 °С до 900 °С (ярко-красное каление).

Озоление ведут до полного исчезновения черных частиц, цвет золы должен быть белым или сероватым. Тигли, по окончании процесса озоления, достают из печи тигельными щипцами, ставят в эксикатор, закрывают его крышкой и охлаждают их до комнатной температуры. Остывшие тигли взвешивают на аналитических весах, причем нельзя брать тигли руками, а только пинцетом или каким-либо другим приспособлением. Затем вторично ставят на дополнительное озоление в муфельную печь на 20 минут, вновь охлаждают в эксикаторе и взвешивают на аналитических весах. Озоление считается законченным, если масса тигля с золой после повторного прокаливания и взвешивания изменилась не более чем на 0,0002 г. Если изменение массы произошло на большую величину, то прокаливание в муфельной печи повторяют еще раз. В случае увеличения массы тигля с золой после повторного прокаливания берут меньшее значение массы.

Озоление с ускорителем (спиртовым раствором уксуснокислого магния). Навеска продукта для определения зольности взвешивается так же, как

описано в предыдущем методе. Поскольку в состав ускорителя входит магний, следовательно, он имеет свою зольность, и она должна быть определена. Для этого в два чистых и прокаленных до постоянной массы тигля наливают пипеткой 3 мл ускорителя и зажигают его. После выгорания спирта, тигли ставят в муфельную печь и прокаливают в течение 20 минут, затем их охлаждают в эксикаторе и взвешивают. По разнице между массой тиглей с ускорителем после прокаливания и массой чистых тиглей устанавливают массу золы ускорителя. Полученное значение массы золы ускорителя, которая состоит из оксида магния, используют в расчете зольности продукта. В два или три тигля с навеской продукта, пипеткой прибавляется по 3 см³ ускорителя. В течение 1-2 минут навеска пропитывается ускорителем (тигли при этом должны стоять в вытяжном шкафу), затем содержимое тиглей поджигают. Происходит выгорание ускорителя, при этом навеска частично разрыхляется, а поверхность ее обугливается. После угасания пламени, тигель щипцами переносят в муфельную печь и ставят у дверцы. Продукты сухой перегонки будут выделяться в виде дыма. После прекращения дымления тигли задвигают внутрь печи и закрывают дверцу.

Озоление ведут в течение приблизительно одного часа при температуре от 600 °С до 900 °С до полного исчезновения черных частиц. Затем тигли вынимают и охлаждают в эксикаторе до комнатной температуры и взвешивают на аналитических весах. Если нет уверенности, что озоление прошло полностью, то тигли дополнительно прокаливают в муфельной печи в течение 20 минут, как описано в предыдущем способе.

Озоление с ускорителем (азотной кислотой). Навеску продукта для определения зольности берут также как описано в первом способе. Взвешенные тигли с навесками помещают у дверцы муфельной печи, нагретой от 400 °С до 500 °С, (темно-красное каление), обугливают навески, не допуская воспламенения продукта. После прекращения выделения продуктов сухой перегонки (дыма), тигли задвигают в муфельную печь и закрывают дверцу.

Озоление ведут до превращения содержимого тиглей в рыхлую массу серого цвета. После этого тигли вынимают из муфельной печи, охлаждают на воздухе до комнатной температуры и добавляют в каждый 2–3 капли азотной кислоты. Тигли ставят у дверцы муфельной печи и осторожно, не допуская кипения, выпаривают кислоту досуха, после чего тигли ставят в глубь муфельной печи нагретой от 600 °С до 900 °С, (ярко-красное каление), закрывают дверцу и ведут озоление в течение 20–30 минут до полного исчезновения темных частиц в золе. После окончания озоления тигли охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивают.

Обработка результатов. Зольность Z , в процентах, каждой навески зерна или муки, в пересчете на сухое вещество, рассчитывают по формуле (19) (если зольность определяется без применения ускорителя или с применением азотной кислоты):

$$Z = \frac{m_z \cdot 100 \cdot 100}{m_n (100 - W)}, \quad (19)$$

где m_z – масса золы продукта, г; m_n – масса навески, г;

W – влажность зерна или муки, %.

Если зольность определялась с использованием ускорителя спиртового раствора уксуснокислого магния, то расчет ведется по следующей формуле (20):

$$Z = \frac{(m_3 - m_y) 100 \cdot 100}{m_n (100 - W)}, \quad (20)$$

где m_3 – масса золы продукта, г; m_y – масса золы ускорителя, г;

m_n – масса навески, г; W – влажность зерна или муки, %.

Расчет ведут до третьего десятичного знака, а результат округляют до второго десятичного знака, и его проставляют в документах о качестве продукта. Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений зольности муки не должно превышать 0,025 %, а при определении зольности зерна не должно превышать 0,05 %. За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, если расхождение между ними не превышает допустимое.

Контрольные определения зольности проводят методом озоления без применения ускорителя. В заключение по лабораторной работе необходимо сделать вывод о правильности полученных результатов и сравнить их с данными из литературных источников.

Контрольные вопросы

- 1) Укажите, из каких элементов состоит зерно, не содержащее влагу?
- 2) Что такое зольность?
- 3) Как, определяют содержание минеральных веществ?
- 4) Оксиды каких элементов преобладают в золе пшеницы и ржи. Указать их процентное содержание?
- 5) Как распределяются минеральные вещества в зерновке?
- 6) Укажите зольность муки пшеничной хлебопекарной высшего, первого, второго сорта и обойной (по стандарту)?
- 7) Как подготовить тигли к работе?
- 8) Как подготовить зерно и взять навеску для определения зольности?
- 9) Какие методы используются для определения зольности?
- 10) В какой момент, по ходу определения, добавляется к навеске азотная кислота?
- 11) Почему спиртовой раствор уксуснокислого магния ускоряет определение зольности?
- 12) Формула для расчета зольности, если применялся основной метод озоления или с ускорителем азотной кислотой?
- 13) Формула для расчета зольности, если озоление велось с ускорителем спиртовым раствором уксуснокислого магния?
- 14) Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений зольности муки?
- 15) Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений зольности зерна?

7 ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В УЧЕБНОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Выполнение лабораторных работ, предусмотренных настоящим практикумом, связано с использованием лабораторного оборудования с движущимися рабочими органами, электронагревательных приборов и спиртовой горелки, химических реактивов, органических растворителей. В связи с этим студент должен знать правила техники безопасности при работе в лаборатории, соблюдение которых необходимо для предотвращения несчастных случаев и опасных ситуаций.

1. В лаборатории запрещено находиться в верхней одежде.

2. К выполнению лабораторной работы не допускаются студенты без защитных халатов (халат любого цвета, с длинными рукавами, застёгнутый на все пуговицы).

3. Запрещено загромождать проходы между рядами и партами сумками, пакетами и т. п.

4. Запрещается помещать какие-либо предметы на электрические розетки, в том числе на розетки, расположенные на металлических стойках.

5. Запрещается прикасаться влажными руками к электрическим розеткам, выключателям, любым электроприборам.

6. Запрещается ремонтировать, чистить или переносить приборы, находящиеся под напряжением. Включённые в сеть электроприборы нельзя оставлять без присмотра.

7. Вращающиеся части оборудования должны быть закрыты (защищены). Включать оборудование при его неисправности категорически запрещается.

8. При работе с лабораторными мельницами запрещено наполнять их более чем на 30 %. Чистить мельницу необходимо с помощью специальной кисточки после отключения прибора от сети. Запрещено перемешивать продукт в мельнице с помощью пальцев или металлических приборов (ложек, вилок, палочек и т.д.), даже если прибор отключён от сети. При размоле проб растительного сырья, при их пересыпании из ёмкости в ёмкость необходимо соблюдать осторожность во избежание попадания растительной пыли на лицо, в глаза.

9. При работе с оборудованием, имеющим высокую температуру, необходимо соблюдать осторожность во избежание ожогов, пользоваться специальными щипцами или рукавицами.

10. При работе со стеклянной посудой необходимо соблюдать предельную осторожность во избежание боя посуды и порезов. Запрещается пользоваться лабораторной посудой для еды и питья.

11. Работа должна выполняться в строгом соответствии с методикой. Запрещается самостоятельно заменять посуду и реактивы, менять продолжительность нагрева проб и вносить иные изменения в методики без разрешения преподавателя.

12. При работе с концентрированными растворами кислот, щелочей, при работе с органическими растворителями запрещается наклоняться над емкостью с этими реактивами во избежание поражения глаз и дыхательных путей.

Первая помощь при возможных несчастных случаях в лаборатории заключается в следующем.

1) В случае пореза принимают меры к прекращению кровотечения. Рану следует обработать йодной настойкой или 3 %-ной перекисью водорода. На рану необходимо наложить стерильную повязку и забинтовать.

2) При тепловых ожогах нельзя смачивать обожжённое место водой. При появлении только красноты ожоги следует обработать бинтом или ватой, смоченными в 96 % этиловом спирте или 3 % растворе перманганата калия. При появлении пузырей обожжённое место обрабатывают спиртом, 3 % раствором перманганата калия или 5 % раствором танина (крепко заваренного черного чая).

Внимание! В случае любой чрезвычайной ситуации студент обязан сразу же поставить в известность преподавателя или инженера лаборатории.

Студенты, не прошедшие инструктаж по технике безопасности, с соответствующей записью в журнале, к работе в лаборатории не допускаются.

Права и обязанности студентов

1. На лабораторном занятии *студент имеет право:*

- задавать преподавателю и/или учебному мастеру вопросы по содержанию и методике выполнения работы;
- на выполнение лабораторной работы по оригинальной методике с согласия преподавателя, при безусловном соблюдении требований безопасности;
- выполнить лабораторную работу, пропущенную по уважительной причине, в согласованные с преподавателем часы, в присутствии учебного мастера;
- быть оценённым по выполненным лабораторным работам в соответствии с Положением о модульно-рейтинговой системе квалиметрии учебной деятельности студентов (МРСК).

2. *Студент обязан:*

- прибыть на лабораторное занятие во время, установленное расписанием, с необходимой предварительной подготовкой. К выполнению лабораторной работы допускаются студенты, подтвердившие готовность в объёме требований, содержащихся в методике к лабораторной работе и (или) в устных предварительных указаниях преподавателя;
- во время занятий соблюдать требования правил внутреннего распорядка АлтГТУ и правила поведения в лаборатории;
- после выполнения лабораторной работы оформить отчёт и представить его преподавателю для проверки с последующей защитой.

3. *Студент несёт ответственность за:*

- пропуск лабораторного занятия по неуважительной причине;
- неподготовленность к лабораторной работе;
- несвоевременную сдачу отчётов по лабораторной работе и их защиту;
- порчу имущества и нанесение материального ущерба лаборатории.

В соответствии с Положением о МРСК, студент, получивший после выполнения и защиты всех лабораторных работ по дисциплине семестровый рейтинг менее 25 баллов, не допускается к экзамену по данной дисциплине.

8 РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Шамраев, А.В. Биохимия [Электронный ресурс]: учебное пособие. – Оренбург: ОГУ, 2014. – 186 с. (Доступ через ЭБС «Университетская библиотека online». Режим доступа: http://biblioclub.ru/index.php?page=book_view_red&book_id=270262)
 2. Рогожин, В.В. Биохимия растений [Электронный ресурс]: учебник. – СПб.: ГИОРД, 2012. – 432 с. (Доступ через ЭБС «Лань». Режим доступа: http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=58741)
 3. Пинчук, Л.Г. Биохимия [Электронный ресурс]: учебное пособие / Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина. – Кемерово: Изд-во КемТИПП, 2011. – 364 с. (Доступ через ЭБС «Лань». Режим доступа: http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=4596)
 4. Рогожин, В.В. Практикум по биохимии [Электронный ресурс]: учебное пособие. – СПб.: Лань, 2013. – 540 с. (Доступ через ЭБС «Лань». Режим доступа: http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=38842)
 5. Нечаев, А.П. Пищевая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.П. Нечаев, С.Е. Траубенберг, А.А. Кочеткова, В.В. Колпакова; под ред. проф. А. П. Нечаева. – СПб.: ГИОРД, 2015. – 669 с. (Доступ через ЭБС «Лань». Режим доступа: http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=4892)
 6. Казаков Е.Д., Карпиленко Г.П. Биохимия зерна и хлебопродуктов. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 512 с.
 7. Биохимия / В.Г.Щербаков, В.Г.Лобанов, Т.Н. Прудникова и др.; под ред. В.Г. Щербакова. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 460 с.
 8. Казаков Е.Д., Кретович В.Л. Биохимия зерна и продуктов его переработки – М.: Агропромиздат, 1989. – 380 с.
 9. Козьмина Н.П. Биохимия хлебопечения. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 278 с.
 10. Аверьянова, Е.В. Физиологически активные вещества растительного сырья [Электронный ресурс]: Учебное пособие / Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьников, Е.Ю. Егорова. – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2010. – 105 с. – Режим доступа: <http://irbis.bti.secna.ru/doc1/2010-123.pdf>; <https://pandia.ru/text/77/451/5404.php>.
 11. МР 2.3.1.1915–04. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. – М., 2004. – 44 с.
 12. Литвяк, В.В. Атлас. Морфология крахмала и крахмалопродуктов / В.В. Литвяк, Н.К. Юркштович, С.М. Бутрим, В.В. Москва. – Минск: Беларус. навука, 2013. – 217 с.
- Допускается использование информации с официальных сайтов сети *Internet*.

9 ТРЕБОВАНИЯ К СТРУКТУРЕ И ОФОРМЛЕНИЮ ОТЧЁТОВ ПО ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ

Отчёт по лабораторной работе оформляется в рабочей тетради каждым студентом индивидуально.

В отчёте должна содержаться следующая информация:

- дата выполнения лабораторной работы;
- номер и название лабораторной работы;
- цель работы;
- описание сущности методик (без сокращений слов);
- содержание полученного студентом индивидуального задания;
- обработка полученных результатов – расчеты, полученные результаты;
- выводы по проделанной работе. В качестве вывода по каждой работе

формулируется **заключение о соответствии** (либо несоответствии) **анализируемого образца** (зерна, муки и т. д.) **по оцениваемому показателю** (влажности, кислотности и др.) **требованиям НД или справочным данным.**

Для отчёта необходимо наличие титульного листа, оформленного в соответствии с приложением А. Отчёты ко всем лабораторным работам должны быть собраны вместе, например, оформлены в одной тетради либо скреплены с помощью скоросшивателя. Титульный лист делается один, общий для отчетов по всем лабораторным работам студента.

Преподаватель проверяет каждый отчёт, подписывает его и проставляет в тетрадь баллы (в соответствии с модульно-рейтинговой системой АлГТУ), полученные студентом при защите лабораторной работы.

ПРИЛОЖЕНИЕ А Титульный лист отчета по лабораторным работам

Форма титульного листа отчёта по лабораторной работе

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова»

Отчёт защищён с оценкой _____

Подпись _____

« ____ » _____ 202__ г.

ОТЧЁТ

к лабораторным работам по дисциплине
«Биохимический анализ продуктов переработки растительного сырья»

Студент группы _____
№ группы, ФИО

Преподаватель _____
уч. степень, должность, ФИО

Барнаул 202__

Электронное учебное издание

Елена Юрьевна ЕГОРОВА
Денис Викторович МИНАКОВ
Анастасия Александровна МИНАКОВА
Галина Сергеевна ВОЛКОВА

БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Учебно-методическое пособие

для бакалавров направлений подготовки
19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья»
и 19.03.01 «Биотехнология» очной и заочной форм обучения

Издано в авторской редакции

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Алтайский государственный
технический университет им. И.И. Ползунова»,
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46.

[В начало](#)