

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра химии

Е.Г. ВЛАДИМИРОВА, Г.И. УШАКОВА, О.П. КУШНАРЁВА

БИОХИМИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом
государственного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Оренбург 2004

ББК 28.072
В57
УДК 663 + 664.6/.7]: 577.112

Рецензент
канд.техн.наук , доцент кафедры ТПП ОГУ Никифорова Т.А.

В57 **Владимирова Е.Г., Ушакова Г.И., Кушнарера О.П.**
Биохимия зерна, биохимия хлебопечения; биохимия
броидильных производств: Методические указания к
лабораторному практикуму. Оренбург:ОГУ, 2004.-61с.

Методические указания предназначены для выполнения лабораторных работ по курсам «Биохимия зерна и продуктов его переработки», «Биохимия хлеба, кондитерских и макаронных изделий », «Биохимия бродильных производств» для студентов 3-го курса, обучающихся по программам высшего профессионального образования по специальностям «Технология хранения и переработки зерна», «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий» «Технология бродильных производств и виноделия».

ББК 28.072

○ с Владимирова Е.Г. 2004

○ с ГОУ ОГУ, 2004

Правила работы в биохимической лаборатории

Приступая к выполнению лабораторного практикума, студент должен быть подготовленным к лабораторному занятию. Подготовка проводится до занятий по учебникам, лекционным записям и методическим пособиям. В специальную тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов.

Во время проведения опытов на рабочем месте не должно быть ничего лишнего, необходимо поддерживать на нем чистоту и порядок. По окончании работы студент должен убрать рабочее место, вымыть лабораторную посуду.

Нельзя уносить приборы, реактивы, цилиндры, пипетки и другие предметы общего пользования на свое рабочее место.

После выполнения цикла лабораторных работ студенты сдают теоретический коллоквиум.

Староста группы на время занятий назначает дежурного по группе. Дежурный отвечает в течение всего занятия за порядок и чистоту рабочих мест, за оборудование общего пользования. По окончании работы дежурный сдает лабораторию учебному лаборанту. Рабочее место, не приведенное в порядок, убирает сам дежурный.

Правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории

Каждый работающий должен знать, где находятся в лаборатории средства противопожарной защиты и аптечка, содержащая все необходимое для оказания первой помощи.

Никакие вещества в лаборатории нельзя пробовать на вкус. Нюхать вещества можно лишь осторожно направляя на себя пары или газы легким движением руки, а не наклоняясь к сосуду и не вдыхая полной грудью.

Приступать к выполнению каждой работы следует только с разрешения преподавателя и после полного уяснения всех ее операций.

Нельзя производить какие-либо опыты в загрязненной посуде. Посуду следует мыть сейчас же после окончания опыта.

Не разрешается работать в лаборатории без халата.

Нельзя оставлять действующий прибор без присмотра.

Концентрированные кислоты и щелочи нужно наливать в сосуд осторожно, под тягой, чтобы не облить рук, не получить брызг на лицо и платье. При наливании концентрированных растворов кислот и щелочей обязательно пользоваться воронкой. Надо твердо помнить правило смешивания концентрированной серной кислоты с водой: не воду лить в кислоту, а наоборот - кислоту в воду небольшими порциями.

В случае воспламенения легкоиспаряющихся жидкостей нужно, прежде всего, потушить горелки, выключить электроприборы, унести все находящиеся поблизости горючие вещества, а затем гасить пламя, засыпая его песком,

закрывая мокрым полотенцем или одеялом. Большое пламя гасят с помощью углекислотных огнетушителей. Не следует заливать пламя водой, во многих случаях это приводит к большему распространению пламени и расширению очага пожара.

В случае воспламенения одежды не следует бежать, надо набросить на пострадавшего халат, брезент, шерстяное или войлочное одеяло. Можно тушить одежду на себе обливанием водой или быстрым перекачиванием на полу.

При легких термических ожогах кожу следует обработать спиртом, а затем смазать глицерином или вазелином. При более сильных ожогах, после обработки спиртом или концентрированным раствором перманганата калия, обожженное место необходимо смазать мазью от ожога.

При ожогах крепкими кислотами необходимо сразу же промыть пораженное место большим количеством воды, а затем 3%-ным раствором гидрокарбоната натрия и опять водой.

При ожогах едкими щелочами обильно промыть пораженное место проточной водой, затем разбавленным раствором уксусной кислоты, а после опять большим количеством воды.

При попадании кислоты или щелочи в глаза следует сразу же их промыть. Для этого направляют небольшую струю воды то в один, то в другой глаз в течение 3-5 минут. Затем глаза необходимо промыть 3%-ным раствором борной кислоты. После этого нужно немедленно обратиться к врачу.

При порезах стеклом необходимо удалить осколки стекла из раны, залить пораженное место спиртовым раствором йода и наложить стерильную повязку. При сильных кровотечениях следует наложить выше раны жгут и вызвать врача или отправить пострадавшего в медпункт.

1 Ферменты

Ферменты - биологические катализаторы белковой природы, образуемые любой живой клеткой и обладающие способностью активизировать различные химические соединения.

Механизм действия ферментов, как и всех других катализаторов, связан со снижением энергии активации, необходимой для прохождения химической реакции, направляя ее обходным путем через промежуточные реакции, которые требуют значительно меньшей энергии активации. Так, реакция $AB \rightarrow A + B$ в присутствии фермента идет следующим образом: $AB + \Phi \rightarrow AB\Phi$; $AB\Phi \rightarrow A + B\Phi$; $B\Phi \rightarrow B + \Phi$.

Все ферменты разделяют на два большие класса: *однокомпонентные* и *двухкомпонентные*.

К первому классу относятся ферменты, состоящие только из белка, обладающего каталитическими свойствами, а ко второму классу - ферменты, которые состоят из белка и связанной с ним небелковой части, так называемой активной группой. Для названия активных групп двухкомпонентных ферментов часто используют термин *кофермент*, или *простетическая группа*. У

однокомпонентных ферментов роль активных групп выполняют определенные химические группировки, входящие в белок. Эти группировки получили название *активных* или *каталитических* центров.

Одним из свойств ферментов, отличающихся от свойств неорганических катализаторов, является их большая лабильность - зависимость от ряда воздействий: концентрации водородных ионов, температуры, окислительно-восстановительных условий, концентрации некоторых соединений (продуктов обмена веществ), ионов металлов и т.п.

Вторая весьма существенная особенность каталитического действия ферментов состоит в том, что оно строго *специфично*, то есть действие ферментов направлено на совершенно определенные химические связи.

По характеру своего каталитического воздействия ферменты разделяются на шесть классов:

- 1) оксидоредуктазы или окислительно-восстановительные ферменты;
- 2) трансферазы, т.е. ферменты, катализирующие перенос различных групп атомов с одной молекулы на другую;
- 3) гидролазы, катализирующие гидролитические реакции;
- 4) лиазы - ферменты, которые отщепляют от субстратов ту или иную группу (не путем гидролиза) с образованием двойной связи или наоборот, присоединяют к двойным связям;
- 5) изомеразы, т.е. ферменты, катализирующие реакции изомеризации органических соединений;
- 6) лигазы или синтетазы - к этому классу принадлежат ферменты, которые катализируют синтетические реакции.

Каждый из этих классов подразделяется на подклассы, а эти последние, в свою очередь, на более мелкие группы.

На всех этапах переработки зерна в муку, в процессе его хранения, а также при приготовлении теста и выпечке хлеба, в большей или меньшей степени проявляется активность гидролитических и окислительных ферментов, оказывающих существенное влияние на качество продукта.

В зерне ферменты содержатся в тканях зародыша, алейронового слоя и эндосперма. Это характерные для живых растительных клеток ферменты, обуславливающие специфические функции в процессах обмена веществ.

Из множества ферментов, обнаруженных в зерне злаков, обстоятельному изучению подверглись лишь те, которые оказывают или могут оказать воздействие на качество продуктов переработки зерна. К ним относятся амилазы, протеазы, липазы, липоксигеназы, полифенолоксидазы и др. Наряду с этим было установлено, что некоторые ферменты зерна могут являться хорошими индикаторами его физиологического состояния. Так, каталаза, являясь очень термолабильной, хорошо отражает понижение всхожести при сушке семенного зерна, и ее активность может служить индикатором для контроля процесса сушки.

Исключительно велико биологическое значение амилаз при созревании и прорастании зерна, а также в ряде технологических процессов пищевых производств, имеющих в своей основе гидролитические превращения крахмала

под влиянием амилаз зерна.

В зерне злаковых культур содержится два специфических фермента, обуславливающих гидролиз крахмала, а именно:

1) α -1,4 - глюкангидролаза или α -амилаза, гидролизующая α -1,4 - глюкановые связи крахмала и родственных ему полисахаридов, причем эти связи разрываются беспорядочно;

2) α -1,4 – глюканмальтогидролаза или β – амилаза, гидролизующая α -1,4 – глюкановые связи в полисахаридах, последовательно отщепляя остатки мальтозы от нередуцирующих концов цепей.

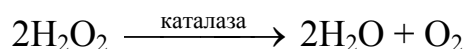
Несмотря на то, что протеазы имеют не менее важное значение для технологии, они изучены значительно меньше, чем амилазы. Причина этого заключается в том, что классические методы изучения протеаз животного происхождения (ферментов, гидролизующих белки) оказались малоэффективными при изучении протеолитических ферментов зерна злаков. Под влиянием протеаз происходит разжижение клейковины, что, в свою очередь, приводит к ухудшению качества выпекаемого хлеба.

Липазы вызывают гидролиз жиров, т.е. расщепляют сложные эфиры глицерина с образованием свободных жирных кислот, в результате чего повышается кислотность зерна и муки.

При участии липоксигеназ происходит окисление непредельных жирных кислот, образуются низкомолекулярные карбонильные и карбоксильные соединения, обладающие неприятным запахом и горьковатым вкусом. Этот процесс называют прогорканием жиров (муки).

1.1 Лабораторная работа №1. Определение активности каталазы

Каталаза относится к первому классу ферментов (оксидоредуктаз) и катализирует реакцию разложения перекиси водорода на воду и кислород по уравнению:



Каталаза играет важную роль в жизнедеятельности организмов, так как она разрушает ядовитую для клеток перекись водорода, образующуюся в процессе дыхания.

Количественное определение каталазы основано на учете перекиси водорода путем титрования ее перманганатом калия. Реакция идет по уравнению:



О количестве перекиси водорода, разрушенной ферментом, судят по разности количеств 0,1 моль/дм³ раствора KMnO_4 , израсходованных на

титрование в контрольном и рабочем опытах.

Испытуемый материал: солод (проросшее зерно)

Реактивы: раствор перекиси водорода ω (H_2O_2) = 1 %

раствор серной кислоты ω (H_2SO_4) = 10 %

раствор перманганата калия C ($1/5 \text{ KMnO}_4$) = 0,1 моль/дм³

5 г испытуемого материала настаивают при комнатной температуре в течение 30 минут со 100 см³ воды, периодически перемешивая содержимое колбы. После настаивания жидкость отфильтровывают через сухой складчатый фильтр и из прозрачного раствора отбирают пипеткой две порции по 20 см³ (одна опытная и одна контрольная) и переносят каждую в отдельную коническую колбу на 200 см³. Контрольную кипятят 3 мин для инактивации фермента.

К опытной и контрольной пробам прибавляют по 20 см³ дистиллированной воды, по 4 см³ перекиси водорода, и оставляют на 20 мин при комнатной температуре для действия фермента. По истечении 20 мин к пробам прибавляют по 5 см³ серной кислоты, и оставшуюся (не разложившуюся) перекись водорода титруют раствором перманганата калия.

Активность каталазы выражают в микромолях перекиси водорода, разложившейся под действием фермента за 1 мин в расчете на 1 г исследуемого материала.

Активность каталазы определяют по формуле:

$$X = \frac{(ka - kb) \cdot 100 \cdot 50}{P \cdot 20 \cdot 20},$$

где X – активность каталазы;

a – количество 0,1 моль/дм³ раствора KMnO_4 , израсходованного на титрование контрольного раствора, см³;

b – количество 0,1 моль/дм³ раствора KMnO_4 , израсходованного на титрование опытного раствора, см³;

K – поправка к титру;

100 – общий объем экстракта, см³;

50 – коэффициент пересчета на микромоли H_2O_2 ;

20 – объем ферментного раствора, см³;

20 – время ферментативной реакции, мин;

P – навеска испытуемого материала, взятого для анализа, г.

1.2 Лабораторная работа №2. Колориметрический метод определения активности α - и β -амилазы

Под действием амилаз в растениях происходит гидролиз высокополимерного углевода - крахмала - с образованием декстринов и мальтозы. В растениях встречаются α - и β -амилазы.

Раздельное количественное определение активности α - и β -амилаз основано на их различной термостабильности: β -амилаза разрушается нагреванием до 70 °С, α -амилаза при этом сохраняет свою активность.

Методы определения активности амилазы основаны либо на учете количества сахара, образовавшегося при действии фермента на крахмал, либо на учете количества нерасщепленного ферментом крахмала, которое определяют фотометрически после обработки раствором иода.

Реактивы: ацетатный буфер с pH 5,5;

раствор хлорида натрия ω (NaCl) =1 %;

раствор крахмала ω = 10 % , (2 г крахмала, размешанного в 20 см³ холодной воды, выливают в 80 см³ кипящей воды, после чего нагревают на кипящей водяной бане до просветления раствора);

раствор соляной кислоты C(HCl) =1 моль/дм³

раствор соляной кислоты C(HCl) =0,1 моль/дм³

раствор йода ω = 0,3 % в 3 %-ном растворе йодистого калия.

Навеску 0,5 - 1 г муки или проростков растирают в ступке с небольшим количеством 1 %-ного раствора NaCl и переносят в коническую колбу на 50 см³. Соотношение между навеской и раствором NaCl 1:10 или 1:20. Содержимое колбы хорошо перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре в течение 30 мин, периодически встряхивая. Затем фильтруют через плотный складчатый фильтр. При трудном фильтровании можно сочетать фильтрование и центрифугирование при 4000-5000 об/мин. Прозрачный раствор используют как ферментный препарат.

Для определения активности α - и β -амилазы берут 4 пробирки (2 опытные и 2 контрольные) и вносят в них по 3 см³ ацетатного буфера и 3 см³ 2%-ного раствора крахмала. Смесь нагревают на водяной бане или в термостате до 40°С. Затем в опытные пробирки вносят по 0,2—1,0 см³ ферментного препарата (в зависимости от активности амилаз в объекте изучения), а в контрольные - такое же количество H₂O. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в термостат при 40 °С на 30 или 60 мин. После инкубации в каждую пробирку сразу приливают по 2 см³ 1 н. раствора HCl для прекращения действия амилаз.

Для выявления непрореагировавшего с ферментом крахмала проводят реакцию с йодом. В мерные колбы на 50 см³ приливают около 30 см³ воды, 1 см³ 0,1 н. HCl, 5 капель 0,3 %-го раствора иода и вносят из каждой пробирки по 0,5 см³ смеси. Содержимое колб хорошо перемешивают, доводят до метки

водой и колориметрируют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре или на спектрофотометре при 595 нм в кювете с рабочей длиной 1 см.

Для определения активности α -амилазы в коническую колбу на 100 см³ приливают 5 см³ фильтрата (ферментного препарата), добавляют на кончике ножа сухого уксуснокислого кальция и выдерживают в течение 15 мин в ультратермостате или на водяной бане при 70°C (допускаются колебания температуры не более 0,5°C). Затем содержимое колбы быстро охлаждают в сосуде с холодной водой. При таком прогревании β -амилаза полностью инактивируется, а α -амилаза сохраняет свою активность. Далее определение α -амилазной активности сводится к описанной выше процедуре.

Действие обоих ферментов выражают в миллиграммах гидролизованного крахмала в условиях опыта (за 30 мин или 1 ч) на 1 г муки (проростков). Активность β -амилазы определяют по разности между суммарной активностью α - и β -амилаз и активностью α -амилазы. Активность амилаз на 1 г муки за 1 ч рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{(D - D_1) \cdot a \cdot V}{D \cdot m \cdot V_1},$$

где D - оптическая плотность контрольного раствора;

D₁ - оптическая плотность опытного раствора;

a - количество внесенного крахмала (60 мг);

m - масса навески, г;

V - объем исходной ферментной вытяжки, см³;

V₁ - объем вытяжки, взятой для инкубирования, см³.

1.3. Лабораторная работа № 3. Определение активности солодовых амилаз.

В проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя содержатся активные α - и β -амилазы. Они хорошо растворяются в воде и могут быть получены в виде водной вытяжки.

Ферменты α - и β -амилазы проявляют свою активность в несколько разных условиях температуры и реакции среды. На этом основано их разделение. β -Амилаза разрушается при нагревании до 70°C, тогда как α -амилаза при этой температуре сохраняет свою активность. α -Амилаза проявляет наибольшую активность в слабокислой среде, при pH 6,3 – 5,6. При более кислой реакции (при pH 4,8 – 3,3) этот фермент разрушается. Фермент β -амилаза в кислой среде не инактивируется. Он имеет оптимум действия при pH 4,8.

Испытуемый материал: солод.

Реактивы: соляная кислота $C(HCl)=0,1$ моль/дм³

соляная кислота $\omega(HCl) = 20 \%$

гидрофосфат натрия $C(Na_2HPO_4) = 0,15$ моль/дм³

раствор йода

раствор крахмала $\omega = 2 \%$

буферный раствор с $pH = 5,6$

сернокислая медь $\omega (CuSO_4) = 6 \%$

едкий натр $\omega (NaOH) = 1,25 \%$

сернокислая медь (раствор Фелинга I) $\omega (CuSO_4) = 4 \%$

щелочной раствор сегнетовой соли (раствор Фелинга II)

раствор железосамородных квасцов

раствор перманганата калия $C(1/5 KMnO_4) = 0,1$ моль/дм³

Выделение α - и β -амилаз солода.

Навеску измельченного солода 20 г смешивают со 100 см³ дистиллированной воды в фарфоровом стакане или колбе и непрерывно перемешивают в течение 15 мин. Затем всю массу оставляют на 30 мин на льду или в холодной воде. По истечении этого времени снова производят перемешивание, после чего массу отжимают через ткань и фильтруют через сухой складчатый фильтр или центрифугируют. Вытяжка из солода содержит α - и β -амилазы.

α -Амилаза может быть изолирована из вытяжки солода при следующих условиях: 10 см³ солодовой вытяжки в пробирке прогревают на водяной бане при 70°C в течение 15 минут (указанная температура должна строго соблюдаться), после чего раствор охлаждают и берут на исследование активности α -амилазы. β -амилаза при указанной температуре инактивируется.

β -Амилаза может быть изолирована из солодовой вытяжки путем инактивирования α -амилазы в кислой среде. Для этого поступают так: 15 см³ солодовой вытяжки вносят в стаканчик, добавляют 3 см³ раствора соляной кислоты с концентрацией 0,1 моль/дм³ и 12 см³ воды с тем, чтобы общий объем составлял 30 см³ (рН при этом должен быть 3,3) и оставляют на льду или в холодильнике на 15 мин.

По истечении этого времени к раствору добавляют 6 см³ раствора гидрофосфата натрия $C(Na_2HPO_4) = 0,15$ моль/дм³ для того, чтобы довести рН до 6,0. в дальнейшем этот раствор берут для определения осаживающей способности β -амилазы.

Опыт 1. Определение декстринирующей способности α -амилазы.

При действии на крахмал α -амилазы образуется большое количество декстринов разного молекулярного веса, по-разному окрашивающихся йодом.

В зависимости от окраски с йодом различают следующие промежуточные продукты расщепления крахмала:

1. Амилодекстрины окрашиваются йодом в сине-фиолетовый цвет, осаждаются спиртом, вращают плоскость поляризации на $+ 196^{\circ}$, восстанавливают реактив Фелинга на 1% по отношению к мальтозе, по своему строению близки к крахмалу. Средний молекулярный вес около 10000.

2. Эритродекстрины окрашиваются йодом в красно-бурый цвет, осаждаются спиртом, вращают плоскость поляризации на 194° , восстанавливают раствор Фелинга на 2-3 %. Средний молекулярный вес 6000-4000.

3. Ахродекстрины почти не окрашиваются йодом, растворяются в 70 %-ном спирте, вращают плоскость поляризации на 192° , обладают 10 %-ной восстанавливающей способностью по отношению к мальтозе. Средний молекулярный вес 3700.

4. Мальтодекстрины не окрашиваются йодом, не осаждаются спиртом, вращают плоскость поляризации на 183° , обладают восстанавливающей способностью на 30-40 % по отношению к мальтозе.

Метод определения декстринирующей способности α -амилазы основан на качественной пробе с йодом. В шесть пробирок, установленных в штативе, вносят по 5 см³ 2 %-ного раствора растворимого крахмала. Затем в каждую пробирку добавляют по 1 см³ буферного раствора с pH =5,6; ферментный раствор и воду вносят в количествах, указанных в приведенной таблице:

№ пробирок	1	2	3	4	5	6
кол-во фермента, см ³	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
кол-во воды, см ³	4	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0

Растворы в пробирках тщательно смешивают и ставят в термостат или водяную баню при 40⁰С. Глубину гидролиза крахмала контролируют по четвертой пробирке. Для этого из нее стеклянной палочкой периодически отбирают пробы по несколько капель жидкости на белую кафельную плитку или фарфоровую чашечку и к ней добавляют каплю раствора йода. Первый отбор пробы делают через 5 минут после начала термостатирования. Частота отбора проб зависит от активности фермента и скорости гидролиза крахмала. Термостатирование продолжают до тех пор, пока проба из четвертой пробирки не дает красно-бурого окрашивания с йодом, что свидетельствует об образовании в этой пробирке эритродекстринов.

После этого в каждую пробирку добавляют по несколько капель раствора йода. Если хотят остановить гидролиз крахмала, то добавляют еще по 2-3 капли 20%-ной соляной кислоты. Содержимое пробирок окрашивается в разные цвета: от синего – в первой пробирке с неизменным крахмалом через фиолетовый, красно-бурый до желтого. Следует указать, исходя из окраски с йодом, до каких декстринов шел гидролиз крахмала в каждой пробирке в зависимости от количества внесенного фермента.

Опыт 2. Определение осахаривающей способности β -амилазы

В мерную колбу на 100 см³ вносят 50 см³ 2%-ного раствора растворимого крахмала и 5 см³ фосфатного буфера с рН-5,6. содержимое пробирки прогревают в водяной бане при 40⁰ С в течение 15 минут. Затем в колбу вносят 5 см³ ферментного препарата β -амилазы. Раствор в колбе перемешивают и снова ставят в водяную баню при той же температуре на 30 минут. По истечении этого времени ферментативный процесс гидролиза крахмала останавливают путем добавления 10 см³ раствора сернокислой меди $\omega(\text{CuSO}_4) = 6 \%$. После этого раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до метки. Количественное определение сахаров производят по методу Бертрана. Пересчет сахаров ведут на мальтозу, как на основной продукт распада крахмала при действии β -амилазы. Мерой активности β -амилазы служит количество разложившегося крахмала, выраженное в процентах от его первоначального веса.

Опыт 3. Влияние температуры на активность β -амилазы

Температура оказывает большое влияние на скорость ферментативной реакции. При низких температурах (0-4⁰С) ферментативные реакции протекают с очень малой скоростью. Температура выше 60⁰С вызывает инактивацию большинства ферментов. Температурный оптимум многих ферментов лежит в пределах 40-50⁰С.

Опыты ставят при температурах 4⁰С (холодильник), 20⁰ С (комнатная), 40⁰С и 60⁰С (водяная баня). Для получения хороших результатов необходимо строго выдерживать условия проведения анализа и в течение всего опыта поддерживать заданную температуру.

В мерную колбу на 100 см³ вносят 50 см³ 2 %-ного раствора крахмала и 5 см³ фосфатного буфера с рН 5,6. Содержимое колбы доводят до заданной температуры (нагревают или охлаждают), после чего вносят 5 см³ ферментного препарата, предварительно термостатированного при той же температуре и замечают время. Гидролиз продолжается 30 минут, в течение которых строго следят за поддержанием постоянной температуры. Через 30 минут в колбу вносят 10 см³ раствора сернокислой меди $\omega(\text{CuSO}_4) = 6 \%$ для прекращения действия фермента, содержимое колбы охлаждают и доводят водой до метки. Количество образовавшейся мальтозы определяют методом Бертрана. Полученные результаты сводят в таблицу и строят график, характеризующий влияние температуры на активность β -амилазы.

Опыт 3. Влияние рН на осахаривающую способность солодовых амилаз

Каждый фермент проявляет свою активность в определенной зоне рН. Для определения влияния рН среды на осахаривающую способность солодовых амилаз проводится коллективная работа. Опыты ставят при постоянной температуре, но разных значениях рН (2,6; 4,4; 5,0; 5,8; 7,0; 8,0 и др.).

В мерную колбу на 100 см³ вносят 50 см³ 2 %-ного раствора крахмала и 5 см³ соответствующей буферной смеси. Содержимое колбы прогревают в термостате или водяной бане до 40°C, после чего вносят 5 см³ фермента, предварительно термостатированного при той же температуре. Продолжительность гидролиза 30 минут. Реакцию прекращают добавлением 10 см³ 6%-ного раствора сернокислой меди, после этого колбу охлаждают, и объем смеси доводят водой до метки. Образовавшуюся под действием амилаз мальтозу определяют методом Бертрана.

Полученные результаты сводят в таблицу и строят график, характеризующий влияние реакции среды на активность ферментов.

Опыт 4. Влияние pH на декстринирующую способность солодовых амилаз

Для выяснения влияния pH на декстринирующую способность амилаз берут 10 пробирок и наливают в каждую по 2,5 см³ буферных растворов, состоящих из следующих количеств 0,2 М раствора Na₂HPO₄ и 0,1 М лимонной кислоты.

№ пробирки	Количество, см ³		pH буферной смеси
	0,2 М р-ра Na ₂ HPO ₄	0,1М р-ра лимонной кислоты	
1	0,27	2,23	2,6
2	1,10	1,40	4,4
3	1,29	1,21	5,0
4	1,39	1,11	5,4
5	1,51	0,99	5,8
6	1,65	0,85	6,2
7	1,82	0,68	6,6
8	2,06	0,44	7,0
9	2,27	0,23	7,4
10	2,43	0,07	8,0

Затем в каждую пробирку приливают по 5 см³ 2 %-ного раствора крахмала и по 2,5 см³ экстракта солода (экстракт следует приливать, начиная с 1-ой пробирки, через равные промежутки времени – 30 сек). Содержимое пробирок после приливания экстракта тщательно перемешивают и оставляют на 10 минут. По прошествии этого времени берут через каждую минуту пробу (2-3 капли) из седьмой пробирки и добавляют две капли йода. Спустя 2 минуты после того, когда содержимое этой пробирки будет давать красно-бурое окрашивание, во все пробирки добавляют по несколько капель йода и

взбалтывают. Раствор йода следует приливать, начиная с первой пробирки, через равные промежутки времени, т.е. через 30 секунд.

На основании полученной окраски содержимого пробирок можно судить о степени расщепления крахмала в зависимости от pH. Там, где получилась слабо-желтая окраска, крахмал расщепился полностью, и, следовательно, pH был оптимальным.

1.4 Вопросы к защите лабораторных работ №1,2,3

- 1) Что представляют собой ферменты?
- 2) В чем заключается каталитическая функция ферментов?
- 3) Что такое энергия активации?
- 4) Объясните механизм ферментативного катализа.
- 5) Из чего состоят ферменты?
- 6) Чем отличаются ферменты от неорганических катализаторов?
- 7) Как зависит активность ферментов от: температуры реакции, кислотности среды, концентрации субстрата?
- 8) Что такое активаторы ферментов? Какие Вы знаете виды активаторов?
- 9) Что такое ингибиторы? Их классификация.
- 10) Что Вы понимаете под специфичностью действия ферментов? Какие вы знаете виды специфичности?
- 11) На какие классы и по какому принципу подразделяют ферменты?
- 12) Какие Вы знаете ферменты: а) 1 класса, входящие в состав зерна и продуктов его переработки; б) 2 класса; в) 3 класса? Охарактеризуйте их.

2 Белки

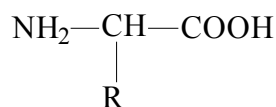
Белки играют исключительно важную роль в жизнедеятельности любого живого организма. Основная масса протоплазмы живых клеток состоит из белков. Белки являются материальной основой жизни и участвуют во всех важнейших процессах, протекающих в живом организме.

Около 25-30 % всей потребности организма в белках покрывается за счёт продуктов переработки зерна. В семенах злаков содержится 10-20 % белка, в семенах бобовых и масличных культур 25-50 %. Именно белковые вещества определяют технологические свойства муки, ее способность давать высококачественный хлеб и макаронные изделия, а также определяют ценность различных круп.

Белковые вещества представляют собой высокомолекулярные биополимеры, первичная структура которых образована полипептидными цепочками, построенными из различных α -аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Молекулярный вес белков может достигать нескольких миллионов.

В настоящее время известно около 220 аминокислот, однако, только лишь 22 α -аминокислоты могут входить в состав белков.

Общая формула α -аминокислот следующая:



Благодаря присутствию аминной и карбоксильной групп, аминокислоты проявляют амфотерные свойства. В водных растворах они диссоциируют как кислота и как основание.

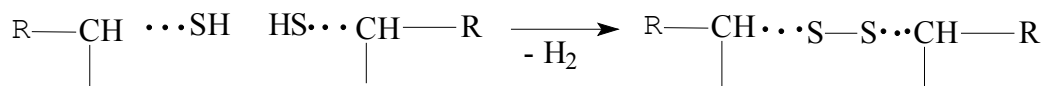
Строение белковой молекулы

Различают четыре уровня структуры или организации белковой молекулы: первичная, вторичная, третичная, четвертичная.

Первичной (линейной) структурой белковой молекулы называется последовательность, в которой отдельные аминокислоты соединяются в полипептидной цепочке.

Вторичная (спиралевидная) структура белковой молекулы образуется благодаря водородным связям, возникающим между отдельными частями длинной полипептидной цепи.

Третичной структурой называют способ упаковки спиралевидной полипептидной цепочки в пространстве. При образовании третичной структуры важную роль играют дисульфидные связи ($-S-S-$), образующиеся при окислении сульфгидрильных групп остатков цистеина:



По форме белковой молекулы, сложившейся на третьем уровне организации, различают белки глобулярные и фибриллярные. Глобулярные белки - растворимые вещества с компактной структурой. По форме они приближаются к шару. Фибриллярные - имеют нитевидную форму. Они обычно нерастворимы.

Четвертичную структуру представляет ассоциация нескольких отдельных полипептидных цепей. Ее создают водородные связи, электростатическое взаимодействие, гидрофобные и другие виды связи.

Классификация белков

По степени сложности все белки делят на две большие группы протеины и протеиды.

Протеинами, или простыми белками, называют белки, в состав которых входят только остатки аминокислот. В состав протеидов кроме остатков аминокислот входят группы небелковой природы - простетические группы, например, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты.

Протеины, в свою очередь, делят еще на четыре группы, основываясь на характере их растворимости: альбумины - растворимые в воде; глобулины - растворимые в водных растворах различных солей (в растворе хлорида натрия); проламины - растворимые в растворе этанола; глютелины - растворимые в растворах щелочей.

Свойства белков

Свойства белков в первую очередь зависят от аминокислотного состава, от взаимного расположения аминокислот, а также от структуры белковой молекулы, элементарного состава и многих других факторов.

Однако, все белки имеют ряд общих характерных свойств. Так же как и аминокислоты, белки являются амфотерными соединениями. Для них характерна изоэлектрическая точка - величина рН, при которой белок как кислота и как основание имеет наименьшую степень диссоциации. При набухании белки образуют коллоидные растворы - студни и гели. Белки являются очень чувствительными веществами к действию физических, химических и биологических факторов, воздействие которых может привести, например, к денатурации белка. Денатурация белков - сложное явление, в основе которого лежит изменение вторичной, третичной и четвертичной структуры белковой молекулы.

В технологических процессах чаще всего встречается тепловая денатурация (например, при сушке зерна, выпечке хлеба). Химический состав белка при денатурации не изменяется, но могут сильно измениться все свойства

белка - физические, химические и биологические.

При взаимодействии белка с некоторыми реактивами образуются окрашенные продукты - белки дают цветные реакции, что зависит от наличия в белковой молекуле той или иной аминокислоты или определенной химической группировки. Этими реакциями можно обнаружить в исследуемом веществе присутствие белков или отдельных аминокислот (тирозина, триптофана, цистеина и др.)

2.1 Лабораторная работа №4. Выделение и анализ простых белков

Опыт 1. Проба на альбумины

Испытуемый материал: измельченное зерно или продукты его переработки
Реактивы: насыщенный раствор хлорида натрия

В колбу берут 2 г испытуемого материала, добавляют 20 см³ воды и содержимое перемешивают, колбу ставят в термостат при 30-35°C на 30 мин. В течение первых 20 мин содержимое пробирки периодически перемешивают. Через 30 мин надосадочную жидкость, содержащую альбумины, отфильтровывают. Часть фильтрата (1-2 см³) используют для биуретовой реакции на белок (см. опыт 3), а к другой части фильтрата добавляют примерно равный объем насыщенного раствора хлорида натрия. При этом раствор мутнеет, т.к. альбумины в присутствии солей теряют растворимость.

Опыт 2. Проба на проламины

Испытуемый материал: измельченное зерно, мука
Реактивы: раствор этилового спирта ω (C₂H₅OH) = 70 %

В пробирку берут 1 г исследуемого материала и 10 см³ раствора этилового спирта. Экстракцию белков ведут при 30-35°C, в течение 20 мин при периодическом перемешивании. Через 20 минут надосадочную жидкость отфильтровывают и в части фильтрата обнаруживают белок по биуретовой реакции. Оставшуюся часть фильтрата разбавляют водой в 2 раза. При этом концентрация спирта резко падает и спирторастворимые белки - проламины - теряют растворимость. Раствор мутнеет.

Опыт 3. Свертывание белка при нагревании

Испытуемый материал: раствор белка

В опыте используют белковые растворы, полученные в опыте №1. В

пробирку вносят 5 см³ испытуемого материала, в который погружают термометр. Затем ее ставят в стакан с теплой водой и начинают постепенно нагревать. Замечают температуру, при которой появилась муть, в дальнейшем превращающаяся в хлопьевидный осадок.

Для проведения цветных реакций готовят мучную суспензию в соотношении 1:5 и разливают ее по 1-2 см³ в пробирки.

Опыт 4. Биуретовая реакция

Испытуемый материал: мучная суспензия, раствор белка

Реактивы: раствор едкого натра ω (NaOH) = 10 %

раствор сульфата меди ω (CuSO₄) = 0,5 %

Щелочной раствор белка дает с сернокислой медью фиолетовую окраску. Окраска обусловлена комплексным соединением меди с пептидными группами (-CO-NH-). Свое название биуретовая реакция получила от производного мочевины - биурета, который дает эту реакцию.

В пробирку к 1-2 см³ мучной суспензии добавляют 2-3 капли раствора сернокислой меди, и после перемешивания добавляют около 2 см³ водного раствора едкого натра.

При смешивании появляется фиолетовое окрашивание. Следует избегать избытка сернокислой меди, так как тогда голубая окраска гидрата окиси меди маскирует фиолетовую окраску.

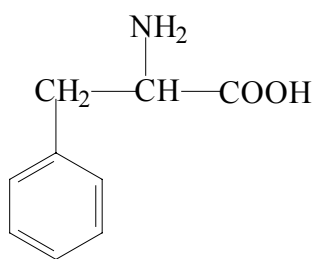
Опыт 5. Ксантопротеиновая реакция

Испытуемый материал: мучная суспензия, раствор белка

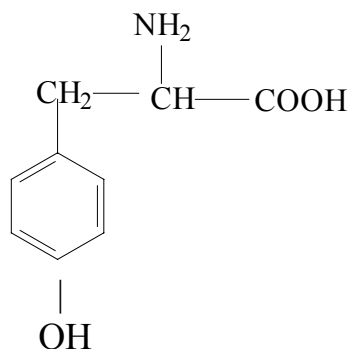
Реактивы: концентрированная азотная кислота

Большинство белковых веществ при нагревании с крепкой азотной кислотой дают желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при добавлении щелочи. Свое название реакция получила от греческого слова "ксантос", что означает желтый.

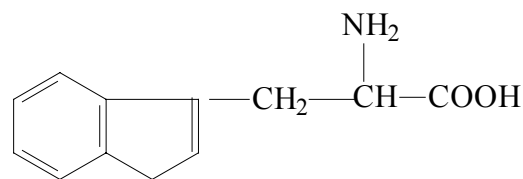
Эта реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот (тирозина, фенилаланина, триптофана).



фенилаланин



тирозин



триптофан

При действии азотной кислоты на эти аминокислоты происходят нитрование бензольного кольца с образованием нитросоединений желтого цвета.

В пробирку к 1-2 см³ мучной суспензии добавляют 5-6 капель концентрированной азотной кислоты. При осторожном подогревании содержимое пробирки окрашивается в желтый цвет. После охлаждения добавляют в избытке едкое кали, при этом желтая окраска переходит в оранжевую.

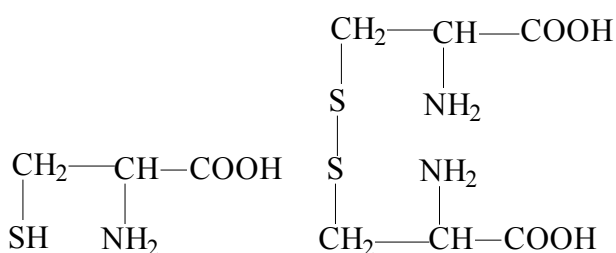
Опыт 6. Реакция на серу

Испытуемый материал: мучная суспензия, раствор белка

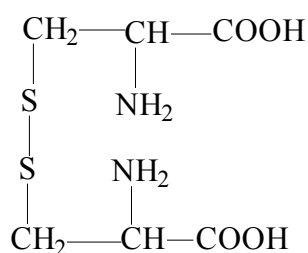
Реактивы: раствор едкого натра ω (NaOH) = 10 %

раствор ацетата свинца ω [(CH₃COO)₂Pb] = 10 %

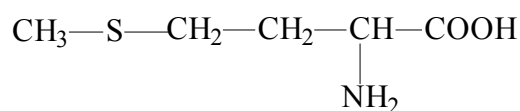
В состав большинства белков входят содержащие серу аминокислоты - цистеин, цистин, метионин:



Цистеин



Цистин



Метионин

Серу в белке можно обнаружить, пользуясь ее свойством давать с солями свинца осадок черного цвета (сульфид свинца). Под действием щелочи сера отщепляется в виде сероводорода. При добавлении раствора ацетата свинца раствор начинает мутнеть, а затем выпадет черный осадок.

В пробирку к 1-2 см³ мучной суспензии добавляют 2-3 капли раствора ацетата свинца. Содержимое пробирки перемешивают, а затем добавляют в него 2-3 см³ раствора едкого натра, перемешивают и нагревают. Содержимое

пробирки начинает темнеть.

2.2 Вопросы к защите лабораторной работы №4

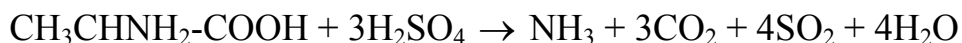
- 1) Что такое белки?
- 2) Каковы физиологические функции белков в живой клетке?
- 3) Какие функциональные группы входят в аминокислоты?
- 4) На какие классы и по каким признакам делятся аминокислоты?
- 5) Какие Вы знаете "незаменимые" аминокислоты? Почему они так называются?
- 6) Какие аминокислоты входят в состав белков?
- 7) Какими свойствами обладают аминокислоты?
- 8) На каком свойстве аминокислот основан синтез белков?
- 9) Какие виды связей обнаружены в белковых молекулах?
- 10) Как устроена белковая молекула?
- 11) Какие виды пространственной организации белковой молекулы вы знаете?
- 12) Какими физическими свойствами обладают белки?
- 13) Каковы химические свойства белков?
- 14) Как можно обнаружить наличие белка в неизвестном объекте?

2.3 Лабораторная работа №5. Определение содержания общего и белкового азота по методу Кьельдаля

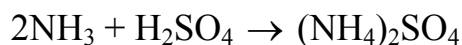
В зерне, предназначенном для продовольственных, кормовых и технических целей, содержание белка определяют по ГОСТ 10846-91 "Метод определения белка".

Сущность метода заключается в превращении азота белковых веществ в соли аммония в результате минерализации зерна в кипящей серной кислоте, дальнейшем подщелачивании продуктов реакции и отгонке выделившегося аммиака в титрованный раствор серной кислоты.

Реакцию с белковыми веществами, в состав которых входят аминокислоты, можно представить идущей по уравнению:



Выделившийся аммиак соединяется с избытком серной кислоты:



Опыт 1. Определение общего азота

Испытуемый материал: измельченное зерно или продукты его переработки

Реактивы: концентрированная серная кислота
катализатор (смесь сернокислой меди, сернокислого калия и селена в соответствии 1:10:0,2)
раствор щелочи ω (NaOH) = 33 %
раствор серной кислоты $C(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$
раствор гидроксида натрия $C(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$
универсальный индикатор
фенолфталеин

Занятие 1. Сжигание.

Около 0,3 г муки или размолотого зерна помещают на беззольный фильтр и взвешивают точно на аналитических весах, затем фильтр с навеской аккуратно сворачивают и опускают в колбу Кьельдаля. Затем туда же приливают 5-6 см³ концентрированной серной кислоты, для ускорения сжигания добавляется 0,3-0,5 г катализатора. Сжигание необходимо проводить под тягой, т.к. выделяется сернистый газ, имеющий неприятный острый запах. Нагревание сначала ведется на слабом огне. После прекращения вспенивания жидкость доводят до кипения и поддерживают его, пока она не станет совершенно прозрачной, окрашенной в зеленоватый цвет. Для полного окисления аминокислот кипячение прозрачной жидкости продолжается еще 15-30 мин.

Опыт 2. Определение белкового азота

Количественное определение белковых веществ и отделение их от других азотосодержащих веществ основано на способности белков осаждаться солями тяжелых металлов и их гидратами. По методу Барнштейна белок осаждается гидратом окиси меди в присутствии медной соли. Осадок нерастворим даже в горячей воде и легко отделяется от небелковых азотистых соединений. Содержание белкового азота (в осадке) определяется по Кьельдалю.

Испытуемый материал: измельченное зерно или продукты его переработки

Реактивы: раствор сульфата меди ω (CuSO_4) = 6 %

раствор гидроксида натрия ω (NaOH) = 1,2 %

1 г испытуемого материала обливают 50 см³ теплой воды (50°C), нагревают на водяной бане при 40-50°C в течение 10 минут. Затем прибавляют 25 см³ раствора сернокислой меди и после тщательного перемешивания медленно приливают 25 см³ едкого натра.

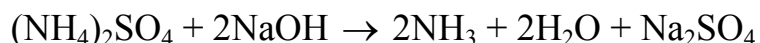
Через час, когда осадок отстоится, его отфильтровывают через предварительно взвешенный фильтр, а осадок несколько раз промывают водой (50°C) до полного обесцвечивания раствора. В фильтрате содержатся

небелковый азот, а в промытом осадке белковый азот. Для определения белкового азота осадок вместе с фильтром подсушивают в сушильном шкафу при температуре 105°C, примерно в течение 3-х часов, взвешивают, после чего переносят его в колбу Кьельдаля и сжигают с серной кислотой. Затем производят определение по методу Кьельдаля. Найденное количество азота пересчитывается на белок умножением на коэффициент 5,7 (для пшеницы, ржи и овса).

Занятие 2.Отгонка.

После сжигания органического вещества колбу снимают с огня и охлаждают. Охладив, в колбу осторожно прибавляют небольшое количество воды (около 30 см³), взбалтывают и количественно переносят в отгонный аппарат и добавляют 2 капли универсального индикатора. В приемную колбу на 50-100 см³ наливают из бюретки точно 20 см³ 0,1 моль/дм³ серной кислоты и несколько капель индикатора фенолфталеина. Отгонную колбу Кьельдаля подсоединяют к прибору и нагревают. Необходимо следить за герметичностью системы. Нагревание раствора в аппарате и отгонка аммиака производится при помощи пара. При появлении первых пузырьков в колбу Кьельдаля через капельную воронку постепенно добавляют 10-20 см³ 33 %-ного раствора NaOH до изменения окраски индикатора, после чего продолжают кипячение 15-20 минут.

При нагревании сернокислый аммоний разлагается с выделением свободного аммиака:



Выделившийся аммиак перегоняется с водяным паром. Конец форштоса холодильника обязательно должен быть погружен в отмеренный объем титрованного раствора серной кислоты для того, чтобы отогнанный аммиак можно было полностью уловить.

Титрование.

Остаток серной кислоты, не связанный аммиаком в приемной колбе, титруют 0,1 моль/дм³ раствором щелочи до нейтральной реакции. Содержание общего азота в анализируемом сухом веществе вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{(ak_1 - bk_2) \cdot 0,0014 \cdot 100 \cdot 100}{P(100 - W)},$$

где X - количество азота, в % на сухое вещество;

a - количество 0,1 моль/дм³ раствора серной кислоты, налитое в приемную колбу, см³;

k₁ - коэффициент поправки для пересчета кислоты на 0,1 моль/дм³

раствора;

b - количество 0,1 моль/дм³ раствора едкого натра, пошедшего на титрование свободной серной кислоты, см³;

k_2 - коэффициент поправки для пересчета щелочи;

P - навеска вещества, г;

W - влажность продукта, %;

0,0014 - коэффициент пересчета на азот, т.к. 1 см³ 0,1 моль/дм³ серной кислоты соответствует 0,0014 г азота.

Вычисление содержания сырого белка

При вычислении содержания белковых веществ условно принимается, что весь азот растительных продуктов является белковым. Полученное по методу Кьельдаля общее содержание азота условно перечисляется на белок, так называемый сырой протеин, умножением полученного процента азота на коэффициент 5,7 или 6,25. Для зерна пшеницы (ржи и овса) и продуктов его переработки принят коэффициент $K=5,7$, рассчитанный для среднего содержания азота в белке 17,54 %.

$$5,7 = \frac{100}{17,54}$$

Содержание сырого протеина вычисляется по формуле:

$$X \cdot K = \% \text{ сырого протеина,}$$

где X - количество азота, %;

K - белковый коэффициент.

2.4 Вопросы к защите лабораторной работы №5

- 1) На какие классы делятся белки? Что лежит в основе этого деления?
- 2) Как распределяются отдельные классы белков по анатомическим частям зерна?
- 3) Каковы отличительные особенности альбумина?
- 4) Что представляет собой глиадин? Какими свойствами он обладает?
- 5) Чем отличаются проламины и глютелины?
- 6) На чем основан метод количественного определения белка по Кьельдалю?
- 7) Почему отгонка аммиака осуществляется при помощи водяного пара?

3 Клейковина, её состав и свойства

Под клейковиной понимают белковый комплекс, образующийся при отмывании теста от крахмала и обладающий упругими и эластичными свойствами.

Клейковина, отмытая из пшеничного теста, представляет собой сильно гидратированный гель, состоящий в основном из белков, но содержащий кроме него углеводы, липиды и минеральные вещества. Содержание компонентов клейковины зависит от сорта муки, ее подготовки к замесу, продолжительности отмывания и различных других факторов. Сумма белков в клейковине составляет 75-99 %, представленных главным образом, глиадином (до 45 %) и глютелином (до 42 %).

Значение клейковины заключается в том, что она формирует тесто. При замешивании муки с водой в процессе приготовления теста отдельные частицы клейковины, набухая, слипаются друг с другом и образуют непрерывную фазу гидратированного белка, в результате чего и образуется компактная, упругая масса теста. Углекислый газ, выделяемый дрожжами при брожении теста, растягивает клейковину, т.е. разрыхляет эту массу, увеличивая ее объем, придает ей мелкопористую структуру, которая закрепляется при выпечке, образуя характерную пористую структуру хлебного мякиша. Качество выпекаемого хлеба во многом зависит от свойств клейковины.

Клейковина является весьма лабильным продуктом и довольно легко изменяет свои вязко-упруго-эластичные свойства под влиянием различных факторов. На свойства клейковины могут оказывать действие, например, активное вентилирование, тепловая сушка, низкие температуры, газация, операции, связанные с подготовкой зерна к помолу (гидротермическая обработка), размол в муку, процессы, происходящие при хранении зерна и муки и, наконец, целый цикл процессов, связанных с приготовлением теста и выпечкой хлеба.

Под влиянием высокой температуры клейковина денатурируется, теряет связность, становится жесткой, неэластичной, малорастяжимой. Причем, чем выше влажность зерна, тем чувствительнее оно к тепловой денатурации. Однако, если зерно имеет слабую клейковину, то кратковременное тепловое воздействие можно использовать как один из способов ее укрепления.

Укрепляющим действием обладают также различные окислители - непредельные жирные кислоты и некоторые другие вещества. При этом происходит окисление сульфгидрильных (-SH-) или пептидных (-CO-NH-) группировок в соседних макромолекулах клейковинного белка, в результате чего возможна их спайка через дисульфидные (-S-S-) или азотные



мостики, что усиливает жесткость всего клейковинного комплекса.

К веществам, понижающим упругие свойства клейковины, относятся такие как бисульфиты, цистеин, мочевины, глутатион, неионогенные эмульгаторы, протеолитические ферменты.

Итак, различают клейковину "нормального качества", "слабую", "крепкую", "крошащуюся" и др. Качество клейковины определяют различными методами, например, по скорости растягивания клейковины под тяжестью пятиграммовой гирьки. Определение качества клейковины производят также с помощью вискозиметра Ауэрмана-Воскресенского. В этом случае о механических свойствах клейковины судят по продолжительности истечения навески 2 г клейковины через отверстие сечением в 4,9 мм под давлением груза в 3 кг. В настоящее время для определения вязко-эластичных свойств клейковины применяют пенетрометры различных марок, а также отечественные приборы ПЭК-3, ПЭК-3А, ИДК-І. С помощью пенетрометров измеряют глубину проникновения в клейковину специального тела с погружением, а с помощью ПЭК-3А и ИДК-І - сжимаемость шарика клейковины под влиянием известного груза за определенное время.

Для суждения о качестве клейковины определяют также её расплываемость. Из клейковины делают шарик, который кладут под стеклянный колпак, и оставляют при определенной температуре на некоторое время. Если была взята мука из зерна, поврежденного клопом-черепашкой, т.е. мука, содержащая активные ферменты, расщепляющие белки, шарик расплывается. Если мука была нормальная, хорошая, то после отлежки форма шарика практически не изменится. Если мука была получена из морозобоинного зерна, то в этом случае, наоборот, шарик клейковины станет даже более компактным.

3.1 Лабораторная работа №6. Определение количества и качества сырой клейковины зерна пшеницы

Опыт 1. Определение количества сырой клейковины

Метод изложен в ГОСТ 13586.І-68 «Зерно. Методы определения количества и качества клейковины пшеницы».

25 г размолотого зерна взвешивают на технических весах с точностью до 0,1 г. Навеску переносят в фарфоровую ступку или чашечку и заливают 13 см³ водопроводной воды. Пестиком или шпателем замешивают тесто, пока оно не станет однородным. Приставшие к пестику или ступке частицы присоединяют к куску теста и хорошо приминают его руками.

Скатанное в шарик тесто кладут в ступку или чашечку, закрывают крышкой (стеклом) и оставляют на 20 минут для набухания клейковины. Затем начинают отмывание клейковины под слабой струей воды с температурой 18-20°С над густым шелковым или капроновым ситом. Сначала отмывают осторожно, чтобы вместе с крахмалом и оболочками не отрывались кусочки клейковины, а когда большая часть крахмала и оболочек будет отмыта - более энергично. Оторвавшиеся кусочки клейковины тщательно собирают с сита и присоединяют к общей массе клейковины.

Допускается отмывать клейковину в тазу или чашке. В таз наливают не

менее 2 л воды, опускают тесто в воду и отмывают крахмал и частицы оболочек зерна, разминая тесто руками. Когда в воде накапливается крахмал и частицы оболочек, воду меняют, процеживая ее через шелковое или капроновое сито.

При выделении клейковины из пшеницы пониженного качества (пораженной клопом-черепашкой, морозобойной, проросшей и т.п.) ее отмывают медленно и осторожно, вначале в тазу. Отмывают до тех пор, пока оболочки не будут полностью отмыты и вода, стекающая при отжимании клейковины, не будет почти прозрачной (без мути).

Клейковина, которая не отмывается, характеризуется как "не отмываемая".

Отмытую клейковину отжимают между ладонями, вытирая их время от времени сухим полотенцем, при этом клейковину несколько раз выворачивают и снова отжимают между ладонями, пока она не начнет слегка прилипать к рукам. Отжатую клейковину взвешивают, затем еще раз промывают 2-3 минуты, вновь отжимают и взвешивают на технических весах.

Если разница между двумя взвешиваниями не превышает $\pm 0,1$ г. то отмывание клейковины считают законченным. Содержание сырой клейковины выражают в процентах к навеске измельченного зерна (шрота).

При контрольных и арбитражных анализах расхождения при определении количества сырой клейковины не должны превышать ± 2 %.

Опыт 2. Определение качества сырой клейковины

Качество сырой клейковины характеризуется упругими свойствами, оцениваемыми приборами (ИДК-I или аналогичными) с технической характеристикой: величина деформирующей нагрузки 120 ± 2 г, продолжительность воздействия деформирующей нагрузки на образец 30 ± 2 сек; пять единиц шкалы соответствует 0,35 мм перемещения пуансона; максимальное расстояние между неподвижным столиком и пуансоном 20 ± 1 мм.

Из отжатой и взвешенной клейковины выделяют навеску 4 г, обминают её 3-4 раза пальцами, формируют в шарик и помещают на 15 минут в чашку или ступку с водой с температурой $18 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем приступают к определению упругих свойств. Если клейковина крошащаяся, после отмывания губчато-образная, легко рвущаяся и не формируется после обминания в шарик, то ее относят к III группе (неудовлетворительная) без определения качества на приборе.

Если масса отмытой клейковины менее 4 г, необходимо увеличить навеску размолотого зерна и заново отмыть клейковину.

Опыт 3. Определение упругих свойств (качества) клейковины при помощи прибора ИДК-I

Прибор состоит из трех основных частей: измерительного блока, стойки и

крышки.

В нижней части измерительного блока укреплен круглый столик, на который помещают испытуемый образец клейковины. Над столиком находится груз пуансон, заканчивающийся диском. При проведении анализа груз свободно перемещается в вертикальном направлении. Продолжительность воздействия груза на образец клейковины ограничивается при помощи реле времени. В остальное время груз заторможен специальным механизмом. Прямолинейное перемещение преобразуется механическим путем во вращательное движение указателя шкалы, расположенного на передней стенке измерительного блока.

Измерение упругости клейковины производят в следующем порядке.

На столик прибора помещают 4-х граммовый образец клейковины. Нажимают кнопку включения реле времени, груз получает возможность свободно опуститься на образец клейковины. По истечении 30 секунд реле времени срабатывает, груз затормаживается, указатель показывает на шкале величину характеристики образца. Записав показания прибора, нажимают кнопку включения реле времени, затем поднимают груз в крайнее положение вверх и, удерживая его таким образом, нажимают на рычажок выключения. Прибор выключен. Испытанный образец клейковины снимают со столика.

Перебивка клейковины перед испытанием не допускается. По величине условных единиц прибора клейковину относят к одной из трех групп по качеству:

Показания прибора в условных единицах	Группа качества	Характеристика клейковины
От 0 до 15	III	Неудовлетворительная крепкая
От 20 до 40	II	Удовлетворительная крепкая
От 45 до 75	I	Хорошая
От 80 до 100	II	Удовлетворительная слабая
От 105 до 120	III	Неудовлетворительная слабая

Показания прибора записывают с точностью до одного деления шкалы (5 условных единиц). Доли до половины деления шкалы отбрасывают, и доли равные половине деления и более считают за целое деление.

При контрольных и арбитражных анализах допускается отклонение ± 5 условных единиц прибора (одно деление шкалы).

Первоначальный анализ считают правильным, если данные его не выходят за эти пределы отклонения. Результаты определения содержания сырой клейковины пшеницы проставляют в документах о качестве зерна

(сертификатах и удостоверениях) с точностью до 1,0 %. При этом десятые доли процента, равные или больше 5 приравнивают к единице, а меньше 5 - отбрасывают: 26,5 = 27 %, 26,7 = 27 %, 26,4 = 28 %. Уход за прибором для измерения упругости клейковины и работу на нем проводят в соответствии с прилагаемой к нему заводской инструкцией по эксплуатации.

Количество и качество пшеничной клейковины нормируется стандартом. Зерно твердой пшеницы должно иметь по стандарту (ГОСТ 9353-90) сырой клейковины в первом классе не менее 26 %, во втором – 25 %, а в третьем – 22 % с качеством по всем классам не ниже второй группы. Зерно мягкой "сильной" пшеницы должно содержать не менее 28 % сырой клейковины по качеству не ниже первой группы (ГОСТ 9353-90).

Опыт 4. Определение количества глиадина пшеницы

Испытуемый материал: измельченное зерно или мука

Реактивы: раствор этанола ω (C_2H_5OH) = 70 %

раствор этанола ω (C_2H_5OH) = 65 %

Отвешивают 3 г клейковины и разрезают на возможно более мелкие кусочки, переносят в колбу (100-150 см³) и заливают 20 см³ раствора спирта с массовой долей ω (C_2H_5OH) = 70%. Концентрация спирта должна быть такой, чтобы после разбавления его водой, содержащейся в клейковине, она была равна 65-66 %. В клейковине содержится в среднем 66 % воды и, следовательно, в 3 г клейковины - 2 г воды. Взятое количество спирта обеспечивает нужную концентрацию спирта.

$$\omega = \frac{30 \cdot 70 \cdot 100}{100 \cdot (30 + 2)} = 65,5\%$$

Глиадин экстрагируют при 20-25°C в течение 30 мин периодически взбалтывая. После этого спиртовой раствор с растворенным в нем глиадином осторожно сливают через фильтр в стакан, клейковину второй раз заливают 20 см³ раствора спирта ω (C_2H_5OH) = 65 %, хорошо взбалтывают и снова ставят на 20 минут для экстрагирования. По истечении этого времени раствор декантируют и пропускают через фильтр в тот же стакан.

10 см³ спиртового экстракта переносят пипеткой в предварительно высушенный фарфоровый стаканчик или чашку для выпаривания. Спиртовой экстракт глиадина сначала выпаривают на водяной бане, остаток (глиадин) высушивают в сушильном шкафу при 105°C до постоянного веса. Сухой остаток взвешивают и вычисляют содержание глиадина в процентах.

При более точных определениях глиадина экстрагирование производят три раза. Полученные экстракты собирают отдельно и концентрируют в вакууме при температуре бани не выше 35°C, начиная с последнего экстракта, чтобы не

подвергнуть излишнему воздействию тепла главную массу глиаина, содержащуюся во втором, и особенно, в первом экстракте. Полученный белок дважды перерастворяют в растворе спирта ω (C_2H_5OH) = 65 %, дважды промывают дистиллированной водой.

Опыт 5. Качественная реакция на глиаин

Отвешивают 1 г клейковина, нарезают на мелкие кусочки, переносят в колбу на 100-150 см³ и заливают 10 см³ раствора спирта ω (C_2H_5OH) = 70 % оставляя затем для экстрагирования на 30 минут, каждые 15 мин содержимое колбы взбалтывают. После настаивания жидкость отфильтровывают. Фильтрат разливают пополам, в две чистые пробирки, к одной из них приливают двукратный объем дистиллированной воды. При снижении концентрации спирта глиаин выпадает в осадок и раствор мутнеет.

3.2 Вопросы к защите лабораторной работы №6

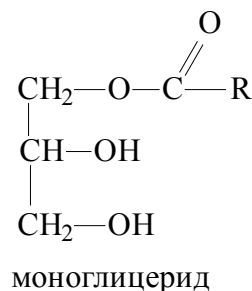
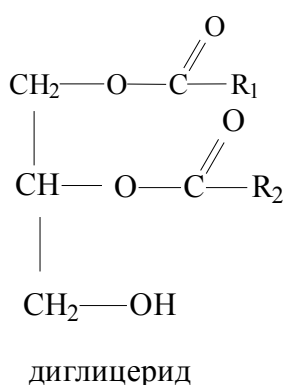
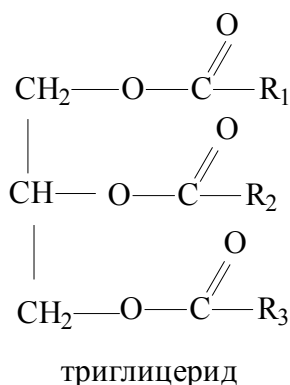
- 1) Что такое клейковина?
- 2) Что и в каком отношении входит в состав клейковины?
- 3) Как получают клейковину?
- 4) Какие вы знаете методы анализа качества клейковины?
- 5) От чего зависят упругие и эластичные свойства клейковины?
- 6) Какие факторы влияют на качество клейковины?
- 7) Как влияют на качество и выход клейковины окислители?
- 8) Какое действие оказывают на клейковину липиды?
- 9) Как можно укрепить клейковину? Ослабить клейковину?
- 10) Какова роль клейковины в процессе хлебопечения?
- 11) Почему нельзя испечь хлеб из рисовой, кукурузной муки?

4 Липиды

Липидами называется сложная смесь органических веществ, выделяемых из растительных и животных объектов. Они обладают близкими физико-химическими свойствами, в первую очередь, нерастворимостью в воде и хорошей растворимостью в ряде органических растворителей (диэтиловом эфире, бензоле, хлороформе, спиртах).

Основную массу этих веществ составляют сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высокомолекулярных жирных кислот – глицериды. Кроме глицеридов в состав липидов входят свободные жирные кислоты, воски, фосфо- и гликолипиды, жирорастворимые пигменты, стерины, жирорастворимые витамины, а также продукты их разнообразных превращений. Основную массу липидов составляют глицериды, которые являются, по существу, жирами.

В состав жиров в основном входят триглицериды, но присутствуют ди- и моноглицериды:



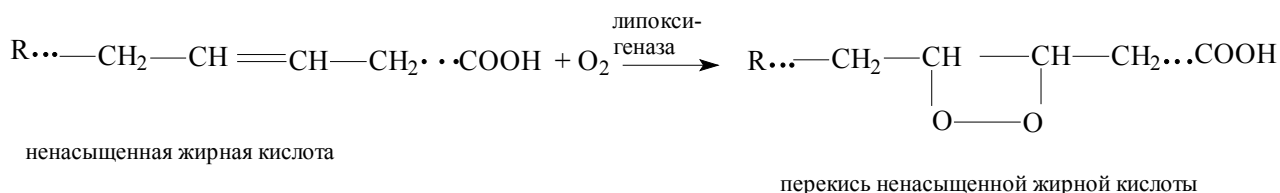
где $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ – радикалы жирных кислот.

Липиды – важные компоненты пищи, во многом определяют пищевую ценность и вкусовые достоинства.

Исключительно велика роль липидов в разнообразных процессах пищевой технологии. Порча зерна и продуктов его переработки при хранении (прогоркание), в первую очередь, связана с изменением его липидного комплекса.

Поскольку в жире содержатся ненасыщенные жирные кислоты, он может легко окисляться. Процесс окисления жира, окисления ненасыщенных жирных кислот, может идти сам по себе за счет присоединения кислорода воздуха по месту двойных связей. Однако этот процесс может значительно ускоряться под влиянием особого фермента, содержащегося в зерне, муке и крупе – липоксигеназы. Она особенно активна в сое и соевой муке.

В результате действия липоксигеназы ненасыщенные жирные кислоты образуют перекиси и гидроперекиси:

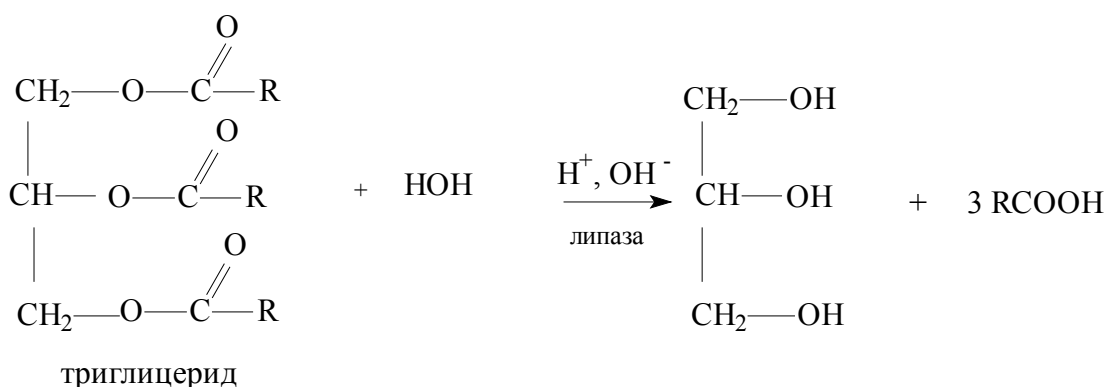


ненасыщенная жирная кислота



Гидроперекиси и перекиси являются очень активными окислителями. Они легко окисляют жирные кислоты, причем образуются неприятные на вкус и запах вещества, вследствие чего жир прогоркает. Поэтому наличие в зерне липоксигеназы способствует прогорканию муки и крупы при хранении. Перекиси и гидроперекиси могут легко окислять также желтые красящие вещества муки – каротиноиды, вследствие чего мука и тесто светлеют.

Это обстоятельство имеет большое значение при изготовлении и сушке макарон. Поэтому в последние годы усиленно изучается активность липоксигеназы у различных сортов твердой пшеницы, из которых готовят муку, используемую в макаронной промышленности. Под влиянием фермента липазы, кислот, щелочей или специальных смесей жиры (триглицериды) гидролизуются с образованием сначала ди-, а затем моноглицеридов и в конечном итоге – жирных кислот и глицерина.



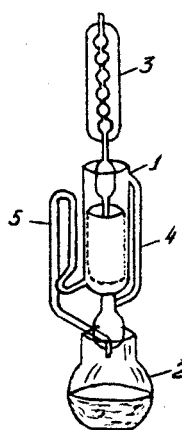
В результате гидролиза повышается общая кислотность зерна и муки.

4.1 Лабораторная работа №7. Определение сырого жира в аппарате Сокслета

Испытуемый материал: мука, измельченное зерно

Реактивы: органические растворители - диэтиловый эфир
(или петролейный эфир, бензин, гексан, этанол, пропанол).

Сущность метода состоит в извлечении жира из продукта органическим растворителем (по ГОСТу - диэтиловый эфир). Извлеченный жир называют сырым, т.к. в него входит не только собственный жир (глицерид), но и все другие растворимые в органических растворителях вещества (липиды). Сырой жир извлекают в аппарате Сокслета. (Рисунок 1)



Аппарат Сокслета

Рис.1.

Навеску муки или тонко размолотого зерна 8-10 г, проходящего без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм, пересыпают в пакетик из фильтровальной бумаги. Образец взвешивают в пакете и по разности массы между пакетом с образцом и пустым пакетом определяют массу взятой навески. Пакет с веществом вкладывают в экстрактор, присоединяют к нему холодильник (3) и колбочку (2), в которую перед этим наливают растворитель на 2/3 её емкости. Количество растворителя должно отвечать полуторному или двойному количеству растворителя, необходимого для заполнения экстрактора.

Пустив воду в холодильник, колбочку с растворителем нагревают до 40-50°C, погрузив её неглубоко в электрическую водяную баню. Пары растворителя, пройдя по широкой трубке экстрактора, конденсируются в холодильнике и в виде капель стекают в экстрактор. Чтобы избежать улетучивания паров растворителя через холодильник, растворитель не должен сильно кипеть.

Работу прибора следует регулировать таким образом, чтобы сливание растворителя по сифонной трубке происходило 8-15 раз в течение часа. При нормальном действии аппарата экстрагирование достаточно вести в течение 6 часов. При более точных определениях и в зависимости от содержания жира в

веществе, экстрагирование продолжается от 10 до 12 часов. По окончании экстрагирования растворителю дают последний раз стечь из экстрактора, прекращают нагревание и разъединяют прибор.

Пакетик с обезжиренным образцом высушивают на воздухе (под тягой) и доводят до постоянного веса, подсушивая в сушильном шкафу при температуре 60°C.

Содержание жира на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(M_1 - M_2)100}{P(100 - W)} \cdot 100$$

где M_1 - масса пакета с навеской до экстракции, г;

M_2 - масса пакета с навеской после экстракции, г;

P - масса навески, г;

W - влажность продукта, %.

4.2 Вопросы к защите лабораторной работы №7

- 1) Что называется липидами?
- 2) На какие классы делятся липиды?
- 3) Чем отличаются свободные, связанные и прочносвязанные липиды?
- 4) Каковы физиологические функции липидов в живой клетке?
- 5) Что входит в состав простых липидов?
- 6) Что называют жирами?
- 7) От чего зависит консистенция жира?
- 8) Какие жирные кислоты входят в состав липидов?
- 9) Какими свойствами обладают жирные кислоты и как они влияют на качество пищевых продуктов?
- 10) На каком свойстве кислот основан способ получения маргарина?
- 11) На какие классы и по какому признаку делятся глицериды?
- 12) Какими физическими свойствами характеризуются глицериды?
- 13) Какие ферменты участвуют в химических превращениях глицеридов и жирных кислот?
- 14) Что понимают под процессом прокисания и прогоркания жиров?
- 15) Что такое мыла и как они образуются?
- 16) Чем отличаются растительные и животные жиры?
- 17) Что представляют собой воски? Каков их состав?
- 18) Что входит в состав сложных липидов?
- 19) Что представляют собой фосфолипиды? Какова их физиологическая функция?
- 20) Что такое гликолипиды?
- 21) Где используются фосфолипиды и гликолипиды в пищевой промышленности?
- 22) Что входит в состав циклических липидов?

23) Какова роль липидов в формировании клейковины?

5 Кислотность зерна

Кислотность зерна и муки является важным показателем их качества. При хранении кислотность, как правило, повышается. Таким образом, она может служить показателем качества, точнее, показателем свежести зерна или продуктов его переработки.

Кислотность зерна и муки зависит от белков, которые содержат карбоксильные группы, связывающие щелочь; от наличия жирных кислот, которые освобождаются в результате расщепления жиров под действием липазы; от фосфорной кислоты, которая в виде различных соединений содержится в зерне в значительном количестве; от уксусной, молочной, яблочной и других органических кислот, обычно содержащихся в зерне и муке в весьма незначительном количестве. Содержание уксусной и молочной кислот сильно увеличивается, если зерно, крупа или мука испортились в результате самосогревания или прокисания.

Существует несколько методов по определению общей кислотности зерна и продуктов его переработки:

- а) титрование болтушки
- б) титрование водной вытяжки
- в) титрование водно-спиртовой вытяжки и другие.

5.1 Лабораторная работа №8. Определение кислотности зерна

Опыт 1. Определение общей кислотности по болтушке по ГОСТ 10844-74

При определении кислотности по болтушке щёлочью оттитровываются все кислореагирующие вещества муки, как растворимые в воде, так и нерастворимые. Сюда относятся свободные жирные кислоты, кислые фосфаты, образующиеся в муке в результате расщепления таких фосфоорганических соединений как фитин, фосфатиды, кислореагирующие группировки белков и продуктов его расщепления; свободные органические кислоты, содержащиеся в зерне. Кроме того, какое-то количество щелочи дополнительно будет связываться с крахмалом.

Испытуемый материал: зерно или продукты его переработки

Реактивы: раствор щелочи $C(\text{NaOH}) = 0,1$ моль/дм³
раствор фенолфталеина

5 г размолотого зерна или муки помещают в коническую колбу на 100-150 см³, в которую наливают 50 см³ дистиллированной воды. Содержимое колбы тщательно размешивают, взбалтывают, чтобы болтушка была совершенно однородной, добавляют 5 капель раствора фенолфталеина и титруют децинормальным раствором щелочи до появления бледно-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин. Титрование ведется медленно, при постоянном

помешивании. Результат выражается в градусах кислотности по формуле:

$$X = \frac{ak \cdot 1000}{P(100 - W)},$$

где k - коэффициент поправки для щелочи;

a - количество 0,1 моль/дм³ раствора щелочи, пошедшее на титрование, см³;

P - навеска, г;

W - влажность муки, %.

Кислотность определяют в трех параллельных навесках. Среднее арифметическое показателей трех определений принимают за фактическую кислотность зерна (муки). Расхождение между показателями параллельных определений кислотности не должно превышать 0,2°.

Навески для определения кислотности взвешивают с точностью до 0,01 г на теххимических весах.

Опыт 2. Определение кислотности по водной вытяжке

При определении кислотности по водной вытяжке щелочью титруются только те вещества, которые растворимы в воде. В основном это будут кислые фосфаты, водорастворимые белки (альбумины), а также свободные органические кислоты и аминокислоты, но не жирные кислоты.

Навеску муки или размолотого зерна 10 г помещают в коническую колбу на 300 см³, приливают точно 100 см³ дистиллированной воды. Тщательно размешав содержимое, колбу оставляют для возможно полного экстрагирования водорастворимых веществ на 1 час при комнатной температуре, периодически взбалтывая. Затем фильтруют жидкость в сухую колбу, с возвратом первых (мутных) порций фильтрата на фильтр. Берут 25 см³ фильтрата пипеткой и переносят в коническую колбочку на 100-150 см³, прибавляют 3 капли фенолфталеина и титруют децинормальным раствором щелочи до бледно-розовой окраски. Кислотность по водной вытяжке вычисляется по формуле:

$$X = \frac{a \cdot k \cdot C \cdot 1000}{P \cdot b \cdot (100 - W)},$$

где k - коэффициент поправки к титру щелочи;

a - объем 0,1 моль/дм³ раствора щелочи, пошедшего на титрование, см³;

С - количество воды, взятое на обработку муки, см³;
Р - навеска, г;
W - влажность муки, %;
b - количество фильтрата, взятое на титрование, см³.

Опыт 3. Определение кислотности по водно-спиртовой вытяжке

По этому методу титруются щелочью все органические кислоты, в том числе жирные, спирторастворимые белки (проламины), аминокислоты, пептиды.

Навеску муки для размолотого зерна 2,5 г высыпают в колбу, приливают 25 см³ раствора спирта ω (C₂H₅OH) = 67 %. Содержимое колбы энергично взбалтывают в течение 5 минут и фильтруют. Пипеткой отбирают 25 см³ фильтрата, приливают к ним 3 капли фенолфталеина и титруют децинормальным раствором щелочи до розовой окраски.

Кислотность выражается по формуле:

$$X = \frac{a \cdot k \cdot C \cdot 1000}{P \cdot b \cdot (100 - W)},$$

где X - кислотность в градусах на сухой вес вещества;

a - количество 0,1 моль/дм³ раствора щелочи, пошедшего на титрование, см³;

k - коэффициент поправки к титру щелочи;

b - количество фильтрата, взятого для титрования, см³;

C - количество спирта, взятого на обработку продукта, см³;

P - навеска, г;

W - влажность продукта, %.

5.2 Лабораторная работа №9. Определение кислотности пива

Кислотность пива, обусловленную присутствием органических кислот и кислых солей (фосфаты, карбонаты), определяют алкалиметрически, титрант - раствор щелочи. Кислотность темного пива определяют потенциометрическим методом.

Цель работы: освоить методику определения органических кислот в пиве методом алкалиметрии.

Испытуемый материал: пиво

Реактивы: раствор гидроксида натрия C(NaOH) = 0,1000 моль/дм³
спиртовой раствор фенолфталеина с массовой долей 1,0 %.

Анализируемое пиво предварительно освобождают от диоксида углерода, нагревая его 30 мин при 40⁰ С и постоянно перемешивая стеклянной палочкой.

Бюретку заполняют титрованным раствором NaOH. В колбу для титрования пипеткой отбирают 20,00 см³ подготовленного и охлажденного до 20 °С пива и несколько капель раствора фенолфталеина, титруют раствором NaOH. Фиксируют появление розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

Точное титрование выполняют не менее трех раз, приливая титрант вблизи точки эквивалентности по каплям. Измеряют объем титранта по бюретке с точностью до 0,05 см³. Вычисляют средний объем титранта, затраченный на титрование - V(NaOH).

Кислотность пива (К, см³ 1 моль/дм³ раствора NaOH на 100 см³ пива) рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{C(NaOH) \cdot V(NaOH) \cdot 100}{V}$$

где C(NaOH) - концентрация титранта, моль/дм³;

V - объем пробы пива, см³;

100 - коэффициент пересчета на 100 см³ пива.

5.3 Вопросы к защите лабораторных работ №8,9

- 1) От чего зависит кислотность зерна, муки?
- 2) Как меняется кислотность продуктов при длительном хранении?
- 3) Как влияет изменение кислотности на качество клейковины?
- 4) Какие факторы влияют на интенсивность изменения кислотности?
- 5) Какие химические превращения приводят к изменению кислотности при хранении зерна с влажностью ниже критической?
- 6) Как влияет повышенная влажность продукта на изменение кислотности? Какие биохимические процессы при этом протекают?
- 7) Какие органические кислоты обуславливают кислотность пива?

6 Углеводы. Моно- и дисахариды

Углеводы образуются в растениях в результате фотосинтеза и составляют большую часть сухой массы растений.

Углеводы играют исключительную роль в жизни растений, они являются структурными элементами растительных тканей, запасными веществами, и служат источником образования различных веществ: белков, жиров, органических кислот, гликозидов, дубильных веществ и т.д.

Все углеводы делятся на две большие группы: моносахариды (простые сахара), представляющие собой по химической природе альдегидоспирты (альдозы) или кетоноспирты (кетозы), и полисахариды – продукты полимеризации моносахаридов.

Среди моносахаридов наиболее распространены в природе пентозы и гексозы, соответственно, с пятью и шестью атомами углерода в молекуле.

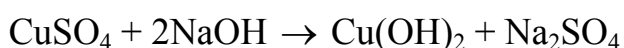
Полисахариды, в свою очередь, делятся на полисахариды I-го порядка (олигосахариды), состоящие из небольшого количества остатков моноз (к ним относятся дисахариды и трисахариды), и полисахариды II-го порядка, состоящие из большого количества остатков моноз. Важнейшими олигосахаридами являются дисахариды: мальтоза, целлобиоза, лактоза, трегалоза, сахароза; из полисахаридов II-го порядка наибольший интерес представляют крахмал, гликоген, клетчатка, пектиновые вещества.

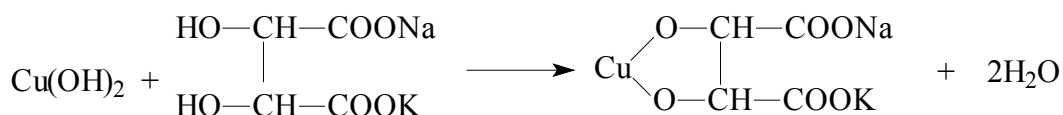
Сахара, имеющие свободные альдегидные или кетонные группы (в циклической форме – свободный гликозидный гидроксил), обладают способностью восстанавливать окисные металлы, например, щелочной раствор окисной меди. При этом медь восстанавливается до закиси меди, а свободная карбонильная (альдегидная или кетонная) группа сахара окисляется. Сахара, которые дают эту реакцию, носят название восстанавливающих (редуцирующих) сахаров. Реакция восстановления окисной меди до закисной лежит в основе количественного определения сахаров по методу Бертрана.

6.1 Лабораторная работа №10. Определение восстанавливающих сахаров по методу Бертрана

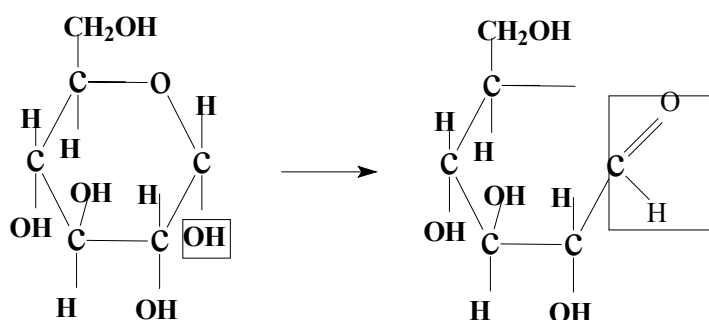
Метод Бертрана основан на способности свободной альдегидной или кетонной группы молекулы сахара взаимодействовать со щелочным раствором окисной меди (реактивом Фелинга) и восстанавливать ее до закисной меди, выпадающей в виде осадка красного цвета. По количеству образовавшейся закиси меди судят о содержании сахара в испытуемом растворе.

Реактив Фелинга представляет собой смесь равных объемов сернокислой меди ω (CuSO₄) = 4 % и щелочного раствора сегнетовой соли. При смешивании сернокислой меди со щелочью выпадает осадок гидрата окиси меди. Сегнетова соль препятствует выпадению осадка, образуя комплексное соединение.



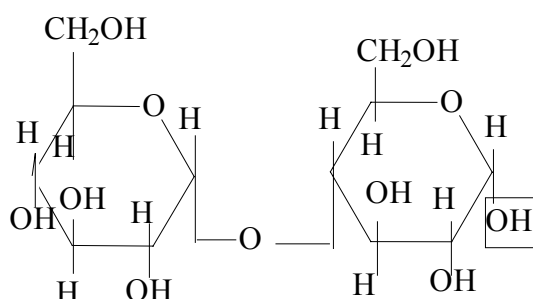


В щелочной среде циклическая (полуацетальная) форма сахара полностью переходит в ациклическую и на месте свободного гликозидного гидроксила образуется альдегидная (у альдоз) и кетонная (у кетоз) группа. Так, например, превращение циклической формы глюкозы в ациклическую протекает следующим образом:



Все моносахариды имеют свободный гликозидный гидроксил и могут взаимодействовать с реактивом Фелинга. Дисахариды, в зависимости от типа связи, подразделяются на восстанавливающие - имеющие свободный гликозидный гидроксил, и невосстанавливающие - не имеющие свободного гликозидного гидроксида.

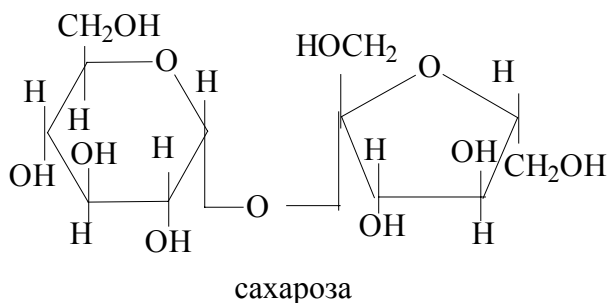
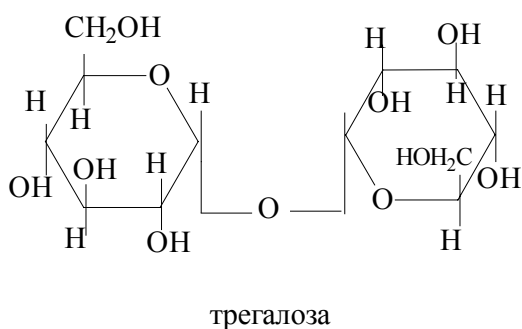
Примером дисахарида, восстанавливающего окисную медь до закисной меди, может служить мальтоза:



В водном растворе на месте свободного гликозидного гидроксила мальтозы образуется альдегидная группа, взаимодействующая с реактивом Фелинга. В молекуле мальтозы один гликозидный гидроксил приходится на два остатка глюкозы, поэтому восстанавливающая способность мальтозы примерно в два раза слабее, чем у глюкозы.

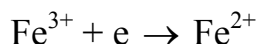
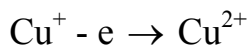
Примером дисахарида, не восстанавливающего Фелингову жидкость, может служить трегалоза (грибной сахар), в молекуле которой два остатка глюкозы соединяются за счет обоих гликозидных гидроксилов. Важнейшим представителем невосстанавливающих дисахаридов является сахароза, в молекуле которой остаток глюкозы и остаток фруктозы соединены так же, как

и у трегалозы - через гликозидные гидроксилы.

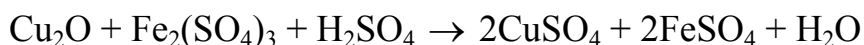
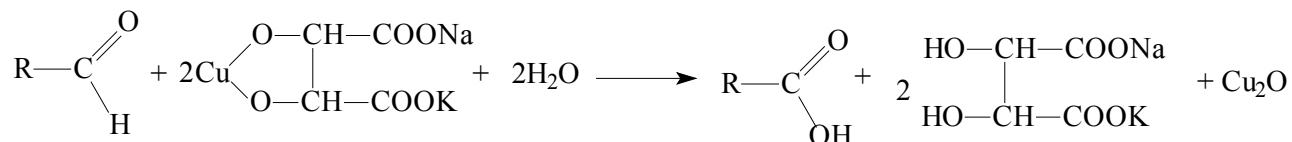


При взаимодействии восстанавливающих сахаров с реактивом Фелинга количество образующейся закисной меди зависит от целого ряда факторов. Поэтому при перерасчете закисной меди на сахар пользуются эмпирическими таблицами. Эти таблицы составлены при строго определенных условиях протекания реакции. Проведение анализа должно соответствовать этим условиям, без каких либо отклонений.

Выпавшую в осадок закисную медь определяют методом объемного титрования. Для этого предварительно отмытый от избытка реактива Фелинга осадок закисной меди обрабатывают раствором железоаммиачных квасцов. Закисная медь переходит в окисную, а эквивалентное количество окисного железа восстанавливается до закисного.



Количество восстановленного железа, эквивалентное количеству закисной меди, определяют титрованием раствором перманганата калия. Весь процесс сводится к следующим реакциям:



Титр перманганата калия устанавливается по меди, что дает возможность сразу пересчитать объем пошедшего на титрование перманганата на эквивалентное количество миллиграммов закисной меди (1 см^3 0,1 моль/дм³

KMnO₄ соответствует 6,36 мг меди).

Метод позволяет провести определение при содержании восстанавливающих сахаров от 10 до 100 мг в 20 см³ раствора. Наилучшие результаты получаются при содержании в пробе 50-80 мг сахара.

Испытуемый материал: мука, солод, корнеплоды, пищевые продукты

Реактивы: раствор сернокислой меди ω (CuSO₄) = 6 %

раствор едкого натра ω (NaOH) = 1,25 %

раствор Фелинга I (сернокислая медь) ω (CuSO₄) = 4 %

раствор Фелинга II (щелочной раствор сегнетовой соли)

раствор железосаммиачных квасцов

раствор перманганата калия C($\frac{1}{5}$ KMnO₄) = 0,1 моль/дм³

раствор уксуснокислого свинца ω ((CH₃COO)₂Pb) = 10 %

10 г испытуемого материала (солод или др.) переносят в мерную колбу на 100 см³ и обрабатывают 40 см³ реактива Барнштейна. Для этого к навеске сначала приливают 20 см³ сернокислой меди ω (CuSO₄) = 4 %, перемешивают, добавляют 20 см³ едкого натра ω (NaOH) = 1,25 % и еще раз перемешивают. Затем в колбу доливают воды до метки и помешают ее в водяную баню или термостат при 45-50°C на 20 мин для лучшего осаждения белков. Через 20 мин содержимое колбы охлаждают и фильтруют через сухой складчатый фильтр. В полученном прозрачном фильтрате определяют восстанавливающие сахара по методу Бертрана.

Для этого 20 см³ фильтрата переносят в коническую колбу на 100-150 см³. В колбу приливают 40 см³ реактива Фелинга, который готовят непосредственно перед определением из равных объемов двух заранее приготовленных растворов (20 см³ сернокислой меди ω (CuSO₄) = 4 % - Фелинг I и 20 см³ щелочного раствора сегнетовой соли - Фелинг II).

Раствор Фелинга готовят в цилиндре. Запрещается пользоваться для этой цели пипетками во избежание сильного ожога рта щелочью. После приготовления реактива колбочку помещают в кипящую водяную баню. Через 7 минут колбочку вынимают из бани и дают некоторое время для оседания закисной меди. Параллельно нагревают колбу с небольшим количеством воды для промывания осадка. Все последующие операции проводятся очень быстро и поэтому требуют хорошего навыка.

Горячую жидкость из колбочки сливают через стеклянный фильтр при слабом отсасывании на колбе Бунзена. Часть закисной меди попадает на фильтр и задерживается в его верхнем слое. Основное количество осадка желательно не переносить на фильтр, а промывать и растворять в колбочке. Колбочку несколько раз ополаскивают горячей водой. В течение всего процесса промывания и растворения осадка надо следить, чтобы осадок в колбочке и на фильтре всегда был покрыт слоем жидкости во избежание окисления его

кислородом воздуха. Окончив промывание, переносят фильтр на другую чистую колбу Бунзена, отмеривают цилиндром 5-10 см³ раствора железосаммиачных квасцов и растворяют им оставшийся в колбе осадок закиси меди. Когда осадок растворится, начинают слабо отсасывать жидкость, одновременно промывая колбочку и фильтр водой. При полном растворении осадка на фильтре не остается темных включений.

Раствор, собранный в колбе Бунзена, титруют перманганатом калия до появления розовой окраски, удерживающейся в течение 1 мин. Количество миллилитров перманганата, израсходованного на титрование, умножают на его титр по меди (для 0,1 моль/дм³ раствора KMnO_4 он равен 6,36 мг Cu_2O), по таблице находят количество сахара, соответствующее данному количеству меди, и выражают его в процентах к весу испытуемого материала.

При работе с солодом пользуются данными таблицы 1

Таблица 1 - Определение мальтозы по Бертрану

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	88,5
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	96,9
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	79,6	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	-	-

Корнеплоды перед анализом тщательно моют и измельчают на терке. Около 1 г измельченного продукта взвешивают в металлическом или стеклянном бюксе и помещают в сушильный шкаф при температуре 130°C на 60 мин до полного высушивания, после чего рассчитывают содержание влаги в продукте по формуле:

$$W = \frac{(a - b) \cdot 100}{m} \%,$$

где а - масса бюкса с навеской до высушивания, г;

б - масса бюкса с навеской после высушивания, г;

т - масса навески, г.

Навеску измельченного корнеплода массой 5 г переносят в мерную колбу на 100 см³, прибавляют 70-80 см³ горячей воды и для экстракции сахаров,

выдерживают 20-30 мин на водяной бане при 80-90°C, периодически взбалтывая. После экстракции колбу охлаждают. Для осаждения белков и других примесей добавляют 5 см³ уксуснокислого свинца (или 20 см³ реактива Барнштейна), перемешивают и доводят водой до метки. После этого жидкость фильтруют через складчатый фильтр в сухой стакан или колбу. Берут 20 см³ фильтрата, переносят его в мерную колбу на 100 см³ и добавляют 3-5 см³ насыщенного раствора сульфата натрия для удаления избытка уксуснокислого свинца. Раствор в колбе перемешивают и доводят до метки. После отстаивания раствор фильтруют, фильтрат служит для определения сахаров. Далее последовательность проведения анализа точно такая же, как и в предыдущем описании, т.е. к 20 см³ фильтрата добавляют 40 см³ реактива Фелинга, кипятят 7 мин, выпавший осадок закиси меди обрабатывают раствором железоаммиачных квасцов и титруют перманганатом калия. Для расчетов используют таблицу 2.

Таблица 2 - Определение глюкозы по Бертрану

сахар, мг	медь, мг	сахар, мг	медь, мг	сахар, мг	медь, мг	сахар, мг	медь, мг
10	20,4	33	64,6	56	105,8	79	144,5
11	22,4	34	66,5	57	107,6	80	146,1
12	24,3	35	68,3	58	109,3	81	147,1
13	26,3	36	70,1	59	111,1	82	149,3
14	28,3	37	72,0	60	112,8	83	150,9
15	30,2	38	73,8	61	114,6	84	152,6
16	32,2	39	75,7	62	116,1	85	154,0
17	34,2	40	77,5	63	117,9	86	155,6
18	36,2	41	79,3	64	119,6	87	157,2
19	38,1	42	81,1	65	121,3	88	158,3
20	40,1	43	82,9	66	123,0	89	160,4
21	42,0	44	84,7	67	124,7	90	162,0
22	43,9	45	86,4	68	126,4	91	163,6
23	45,8	46	88,2	69	128,1	92	165,2
24	47,7	47	90,0	70	129,8	93	166,7
25	49,6	48	91,8	71	131,4	94	168,3
26	51,5	49	93,6	72	133,1	95	169,9
27	53,4	50	95,4	73	134,7	96	171,5
29	55,3	51	97,1	74	136,3	97	173,1
29	57,2	52	98,9	75	137,9	98	174,6
30	59,1	53	100,6	76	139,6	99	176,2
31	60,9	54	102,3	77	141,2	100	177,8
32	62,8	55	104,1	78	142,8	--	--

6.2 Вопросы к защите лабораторной работы №10

- 1) Что представляют собой углеводы, на какие классы они делятся?
- 2) Каковы функции углеводов в живой клетке?
- 3) На какие классы делятся моносахариды? Какие функциональные группы они содержат?
- 4) Что называют мутаротацией?
- 5) Какие таутомерные формы глюкозы и фруктозы вы знаете?
- 6) При помощи каких ферментов осуществляется превращение глюкозы во фруктозу?
- 7) Каков механизм образования гликозидного (полуацетального) гидроксила?
- 8) Что понимают под редуцирующими веществами?
- 9) За счет каких функциональных групп проявляются восстанавливающие свойства моносахаридов?
- 10) Каков механизм образования дисахаридов?
- 11) На какие классы делятся дисахариды? Что лежит в основе этой классификации?
- 12) На проявлении каких свойств основан метод количественного анализа сахаров по Бертрану?
- 13) Какие Вы знаете восстанавливающие дисахариды? Почему их так называют?
- 14) Какие Вы знаете невосстанавливающие дисахариды? В чем их структурное отличие от восстанавливающих дисахаридов?
- 15) Что такое инверсия? Под влиянием чего она может происходить?
- 16) Что называют инвертным сахаром?
- 17) При помощи каких методов анализа можно обнаружить протекание инверсии?

7 Полисахариды. Крахмал и клетчатка

Крахмал

Крахмал – главное из веществ, содержащихся в зерне злаков. Он представляет собой полимер, состоящий из остатков α -D-глюкозы. В зерне крахмал находится в виде крахмальных зерен различного размера и формы. Крахмал дает очень характерную реакцию с раствором йода - окрашивается в синий цвет. Эта реакция применяется для обнаружения и количественного определения крахмала.

Крахмальные зерна при нагревании в воде образуют крахмальный клейстер. Клейстеризация крахмала разного происхождения наступает при различной температуре. Пшеничный крахмал клейстеризуется при 62,5°C, ржаной - при несколько более низкой температуре.

Крахмал состоит из амилозы и амилопектина. Эти вещества сильно различаются по своим физическим и химическим свойствам. Так, например, от йода амилоза окрашивается в синий цвет, а амилопектин - в красно-фиолетовый. Они различаются и по растворимости: амилоза легко растворяется в теплой воде и дает растворы со сравнительно невысокой вязкостью, в то время как амилопектин растворяется в воде лишь при нагревании и под высоким давлением, и дает очень вязкие растворы.

Амилоза и амилопектин отличаются по своему химическому строению. В молекуле амилозы отдельные остатки глюкозы связаны между собой в виде неразветвленной нити. Молекулярная масса амилозы колеблется от 3×10^5 до 1×10^6 . Если амилоза представляет собой линейный полимер, то молекула амилопектина сильно разветвлена. Молекулярная масса амилопектина достигает сотен миллионов.

Разнообразные методы определения содержания крахмала основаны на его расщеплении и учете образовавшихся промежуточных или конечных продуктов гидролиза. Одним из наиболее быстрых, хотя и менее точных методов определения содержания крахмала является метод Эверса.

Определение содержания крахмала по методу Эверса основано на способности фракций крахмала, полученных в процессе гидролиза, поворачивать плоскость поляризованного луча. Величина угла поворота для одного и того же вещества пропорциональна его концентрации в растворе.

7.1 Лабораторная работа №11. Определение содержания крахмала

Испытуемый материал: мука, размолотое зерно

Реактивы: раствор соляной кислоты ω (HCl) = 1,124 %

раствор гексацианоферрата калия ω ($K_4[Fe(CN)_6]$) = 15 %

В мерную колбу на 100 см³ вносят 5 г тонкоизмельченного зерна,

приливают 25 см³ раствора соляной кислоты, тщательно взбалтывают, чтобы не оставалось комочков, снова приливают 25 см³ той же кислоты, смывая частички муки, приставшие к горлу колбы, все взбалтывают и нагревают колбу 15 минут в кипящей водяной бане. После гидролиза крахмала в колбу приливают 30 см³ холодной воды, содержимое колбы охлаждают до 20°C и для осаждения белка приливают 10 см³ раствора желтой кровяной соли с массовой долей $\omega(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 15\%$. Содержимое колбы доводят дистиллированной водой до метки и фильтруют через сухой складчатый фильтр в сухую колбу. Совершенно прозрачный фильтрат наливают в поляризационную трубку так, чтобы в ней не оставалось пузырьков воздуха, затем трубку переносят в поляриметр и определяют угол вращения. Содержание крахмала определяют по формуле:

$$X = \frac{\alpha \cdot 100 \cdot 100}{[\alpha]_D^{20} \cdot P \cdot l \cdot (100 - W)} \cdot 100 \cdot 0,3469,$$

где X – содержание крахмала, %

α - угол вращения в градусах;

P - навеска муки, г;

l - длина поляризационной трубки, дм;

W - влажность испытуемого вещества, %;

$[\alpha]_D^{20}$ - удельное вращение декстринов, +182,8°;

0,3469 - величина переводного коэффициента с круглой шкалы поляриметра на нормальную шкалу сахариметра (одно деление нормальной шкалы равно 0,3469 градуса).

Для каждого оптически активного вещества характерной константой является его удельное вращение. Удельным вращением называется угол вращения, который имеет раствор, содержащий в 100 см³ 100 г вещества при длине трубки 1 дм. Его выражают через $[\alpha]_D^{20}$, где 20 означает температуру раствора, а D - линию спектра (натриевое пламя).

Удельное вращение фракций, полученных из крахмала различных культур, в градусах:

картофеля – 194,5

риса – 183,9

ржи – 184,0

пшеницы – 182,0

ячменя – 181,5

овса – 181,3

Клетчатка

Клетчатка (целлюлоза) $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_{11})_n$, представляет собой наиболее широко распространенный полисахарид растений, состоящий из остатков α -D-глюкозы

и образующий главную составную часть клеточных стенок. Основные источники клетчатки - волокно хлопчатника, волокнистые растения (лен, конопля), солома, древесина. В растениях клетчатка тесно связана с лигнином, гемицеллюлозой, пектиновыми веществами, смолами, липидами. Клетчатка нерастворима в воде, в органических растворителях, а также в разбавленных кислотах и щелочах.

7.2.Лабораторная работа № 12. Определение содержания клетчатки

Опыт 1. Определение клетчатки по Кюршнеру и Ганеку

Испытуемый материал: семена растений

Реактивы: смесь (по объему 1:10)

а) концентрированная азотная кислота HNO_3 ($\rho = 1,44 \text{ г/см}^3$)

б) раствор уксусной кислоты $\omega(\text{CH}_3\text{COOH}) = 80 \%$

диэтиловый эфир

этиловый спирт

Навеску около 1 г крупноизмельченных семян помещают в колбу на 150 см^3 , приливают 40 см^3 смеси кислот; закрыв колбу, нагревают ее на песчаной бане в течение 40 мин. Полученный белый осадок отфильтровывают через предварительно взвешенный фильтр. Осадок промывают небольшими порциями дистиллированной воды и затем 100 см^3 смеси спирта с эфиром. Полученный осадок (клетчатку) высушивают на фильтре до постоянного веса при температуре 105°C. Процентное содержание клетчатки вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(B_1 - B) \cdot 100}{H},$$

где X – содержание клетчатки, %;

B_1 – вес фильтра с сухим осадком, г;

B – вес фильтра без осадка, г;

H - навеска, г.

Опыт 2. Определение содержания клетчатки по методу Геннеберга и Штомана

Испытуемый материал: семена растений, отруби и др.

Реактивы: раствор серной кислоты $\omega(\text{H}_2\text{SO}_4) = 5 \%$;

раствор едкого кали $\omega(\text{KOH}) = 5 \%$.

2г испытуемого материала высыпают в стакан емкостью 400 см^3 , на котором делают метки по 50 см^3 (всего 200 см^3). Навеску заливают водой до

50 см³, добавляют 50 см³ серной кислоты и воды до 200 см³. По мере выкипания в стакан подливают дистиллированную воду, чтобы общий объем жидкости оставался на уровне 200 см³. Затем жидкость охлаждают и отсасывают через матерчатый фильтр с помощью вакуумного (водоструйного) насоса до 50 см³. Приливают дистиллированной воды до 150 см³ и добавляют 50 см³ раствора едкого калия. Вновь кипятят на плитке в течение 30 мин, после чего заливают холодной дистиллированной водой доверху. Затем жидкость отсасывают до 50 см³, и остаток промывают горячей водой до 150 см³. Обработанный таким образом продукт фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный фильтр. Осадок на фильтре промывают горячей водой до нейтральной среды (по фенолфталеину) и высушивают в термостате при 105°C до постоянной массы (3-4 часа). Расчет содержания клетчатки проводят по формуле:

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

где X – содержание клетчатки, %;
 a – масса фильтра с осадком, г;
 b – масса бумажного фильтра, г;
 m – масса навески материала, г;
 W – влажность материала, %.

7.3 Вопросы к защите лабораторных работ №11, 12

- 1) Что называют полисахаридами?
- 2) Какие полисахариды вы знаете?
- 3) Каковы функции полисахаридов в живой клетке, в частности, в растительной?
- 4) Что представляет собой крахмал?
- 5) Разновидности крахмала; как они образуются, и какова их физиологическая роль?
- 6) Какими свойствами обладает крахмал?
- 7) В чем различие амилозы и амилопектина?
- 8) Какие ферменты участвуют в гидролизе крахмала, и какие при этом образуются продукты?
- 9) Чем отличаются α - амилаза и β -амилаза?
- 10) В чем различие ферментативного и кислотного гидролиза?
- 11) На чем основан метод определения содержания крахмала по Эверсу?
- 15) Что представляют собой пентозаны? Какова их физиологическая роль?
- 13) Что относится к пектиновым веществам? Где они используются?
- 14) Что представляют собой слизи (гумми)? Как влияют они на формирование и свойства клейковины (например, ржи)?
- 15) Что называют клетчаткой? Каков ее состав?

- 16) Какова физиологическая роль клетчатки?
- 17) Чем отличается целлюлоза от крахмала?
- 18) Что такое гемицеллюлоза и каков ее состав?

8 Прораствание зерна

Для прораствания зерна необходимы три условия: влага, доступ кислорода и известный минимум тепла. При соблюдении этих условий резко усиливается действие ферментов зерна, начинается процесс гидролитического расщепления отложенных в эндосперме сложных веществ с образованием более простых – растворимых в воде, следовательно, доступных для подачи в развивающийся росток. Наряду с этим сильно возрастает дыхательный газообмен зерна. Отсюда следует, что одной из наиболее характерных особенностей прорастваяющего зерна является повышение активности всех гидролаз и оксидоредуктаз, которое часто обнаруживается еще до появления внешних признаков прораствания. Этими особенностями и определяется изменение технологических и, в первую очередь, хлебопекарных свойств зерна.

Особое значение имеет увеличение активности α -амилазы, так как она является главной причиной резкого ухудшения хлебопекарных качеств муки, полученной из проросшего зерна. Именно в результате того, что в зерне при прораствании так сильно повышается активность амилаз, мука, полученная из проросшего зерна, даёт плохой хлеб с невкусным, заминающимся, неэластичным и недостаточно пористым мякишем. Вследствие действия амилаз уменьшается содержание крахмала, который расщепляется с образованием значительного количества растворимых сахаров. Мука приобретает сладковатый привкус, снижается ее влагопоглощительная способность.

Активизирующиеся протеолитические ферменты гидролизуют белки с образованием полипептидов и аминокислот. В результате повышается растворимость белков в воде, снижается содержание собственно белков и, соответственно, увеличивается количество небелковых азотистых соединений и свободных аминокислот. Клейковина теряет упругость, становится слабой, липкой, а затем полностью разрушается. Изменение свойств клейковины при прораствании влечет за собой изменение свойств теста. Величина влагопоглощительной способности резко снижается; не обеспечивается необходимый подъем теста, формирование пористости мякиша.

Липиды являются важным источником энергии для прораствания зерна; в процессе прораствания их содержание резко снижается. При общем снижении количества свободных липидов во всей зерновке повышается кислотное число, что говорит о накоплении свободных жирных кислот при прораствании пшеницы. Это объясняется гидролитическим действием фермента липазы, расщепляющей глицериды на глицерин и свободные жирные кислоты.

Мука, полученная из проросшего зерна, темнее нормальной, так как образующиеся при гидролизе крахмала декстрины взаимодействуют со свободными аминокислотами, в результате чего синтезируются меланоиды – вещества, от которых зависит окраска, как корочки хлеба, так и мякиша.

Методы распознавания муки из проросшего зерна основаны на том, что такая мука имеет повышенную активность α -амилазы. Из имеющихся методов распознавания муки из проросшего зерна наиболее распространена колобковая выпечка.

8.1 Лабораторная работа №13. Колобковая выпечка для распознавания муки из проросшего зерна

(по Козьминой и Попцовой)

Навеску в 15 г испытуемой муки замешивают с дистиллированной водой (8-9 см³) в колобок, выпекают тотчас же в хлебопекарной печи в течение 15 мин при 180-200°C. После остывания колобок разрезают и оценивают консистенцию его мякиша. Мука из проросшего зерна дает мякиш с характерной липкостью. Для более точного выражения дефектности мякиша определяют в нем содержание воды и растворимых веществ.

Для определения влажности 1 г мякиша помещают в термостат на 1,5 часа при температуре 105⁰С. Расчет ведется по формуле:

$$W = \frac{a-b}{a} \cdot 100\%,$$

где W - влажность мякиша, %;

a - масса мякиша до высушивания, г;

b - масса мякиша после высушивания, г

Для этого 5 г мякиша разминают в ступке с небольшим количеством воды (10-15 см³). Полученную болтушку переносят в мерную колбу на 50 см³ и доливают до метки воду. Извлечение растворимых веществ продолжается 1 час при комнатной температуре, причем содержимое колбы несколько раз взбалтывают. По окончании экстракции вытяжку фильтруют через складчатый фильтр, отбирают определенный объем (20-25 см³) фильтрата в фарфоровую чашку, заранее взвешенную. Жидкость выпаривают на водяной бане, а остаток высушивают до постоянного веса при 105°C.

Содержание водорастворимых веществ рассчитывается на сухое вещество по формуле:

$$X = \frac{a \cdot c \cdot 100 \cdot 100}{P \cdot K \cdot (100 - W)},$$

где X - содержание водорастворимых веществ в мякише, %;

a - масса сухого остатка, г;

c - количество см³ воды, взятое для растворения мякиша;

P - навеска мякиша, г;

K - объем фильтрата, взятый для выпаривания, см³;

W - влажность мякиша, %.

Определение содержания сухих веществ можно проводить на рефрактометре. В этом случае содержание водорастворимых веществ в мякише рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 10 \cdot 100}{100 - W},$$

где X - содержание водорастворимых веществ в мякише, %;

a - содержание сухих веществ в растворе, найденное по таблице для рефрактометра, %;

W - влажность мякиша, %.

8.2 Вопросы к защите лабораторной работы №11

- 1) Какие изменения происходят в углеводном комплексе зерна при прорастании?
- 2) Что происходит в липидном комплексе зерна при прорастании?
- 3) Как меняется белковый состав и качество клейковины при прорастании зерна?
- 4) Как влияют биохимические процессы, протекающие при прорастании зерна, на газообразующую, газоудерживающую, водопоглотельную способность?
- 5) Почему мякиш хлеба, выпеченного из проросшего зерна, имеет повышенную влажность?
- 6) Почему мякиш липкий?
- 7) Как и почему меняется содержание водорастворимых веществ?
- 8) Почему мякиш хлеба из проросшего зерна темный?
- 9) Как можно улучшить качество проросшего зерна?
- 10) Как можно улучшить качество клейковины?
- 11) В каких отраслях пищевой промышленности используют проросшее зерно (солод) и почему?

9 Хлебопекарные качества муки. Биохимические процессы, протекающие при замесе теста и выпечке хлеба

Из зерна пшеницы получают муку пшеничную, хлебопекарную и макаронную. Свойства муки, обуславливающие качество хлеба, представляют собой хлебопекарные качества муки.

Хлебопекарные качества муки в основном определяются совокупностью следующих ее свойств: сахарообразующей, газообразующей, газодерживающей и водопоглотительной способностями, цветом муки, крупностью частиц помола. Газообразующая способность, в свою очередь, зависит от количества в муке ее "собственных" сахаров, перешедших в муку из зерна и содержащихся в ней еще до замеса теста; от сахарообразующей способности муки, то есть способности образовывать в тесте мальтозу в результате действия амилаз на крахмал муки, от качества (активности) дрожжей.

В пшеничной муке содержится от 1 до 2,5 % сахара, главным образом, сахарозы, которая очень легко расщепляется под влиянием выделяемой дрожжами сахаразы (α -фруктофуранозидазы). Получающаяся смесь глюкозы и фруктозы легко сбраживается дрожжами.



Однако, этого количества сахара недостаточно, чтобы процесс брожения теста шел до конца. Собственный сахар муки используется только на самых первых этапах брожения теста, а потом его уже не хватает. На следующих этапах на первый план выступает мальтоза, образующаяся благодаря действию β -амилазы. В тесте под влиянием амилазы крахмал расщепляется с образованием мальтозы. В свою очередь, мальтоза расщепляется, образуя две молекулы глюкозы, которая сбраживается дрожжами. Если мука имеет низкую амилалитическую способность (активность), в тесте не будет образовываться достаточное количество мальтозы и глюкозы, брожение не будет протекать интенсивно и хлеб получится плохого качества, с недостаточно пористым, недостаточно разрыхленным, плотным мякишем. Мука с низкой активностью α -амилазы дает тесто, в котором образуется мало декстринов, поэтому хлеб получается с бледной коркой. Такую муку практики называют "крепкой на жар".

Газодерживающая способность муки зависит, прежде всего, от свойств содержащихся в тесте белков, от количества и качества клейковины. В пшеничном тесте она образует тот растяжимый эластичный каркас, в котором накапливаются пузырьки углекислого газа, поднимающие тесто. Этот белковый каркас во время брожения теста постепенно расширяется.

При образовании пшеничного теста происходит, прежде всего, осмотическое связывание воды вначале свободным промежуточным белком,

затем белком, окружающим отдельно лежащие крахмальные зерна и, наконец, белком, содержащемся в более крупных частицах муки, представляющих собой неразрушенные клетки эндосперма. При поглощении воды белок сильно увеличивается в объеме и постепенно образуется непрерывная структура теста, представляющая собой сетку клейковины, в которую включены крахмальные зерна и другие растворимые частицы муки.

В это же время происходит набухание крахмальных зерен, причем, чем больше содержится поврежденных крахмальных зерен, тем больше его водопоглотительная способность. Добавление соли во время замеса теста несколько снижает гидратационную способность клейковины. Вода и бродильные микроорганизмы вызывают в муке комплекс сложных биохимических превращений. Эти превращения, завершающиеся в процессе выпечки, оказывают глубокое воздействие, как на физические свойства теста, так и на вкус и аромат готового продукта.

Процесс брожения представляет собой сложный комплекс биохимических превращений, конечными продуктами которых являются углекислый газ и этиловый спирт. Во время брожения наблюдается сильное повышение активной кислотности среды за счет увеличения суммарного содержания органических кислот, большую часть которых составляют молочная и уксусная кислоты. Кроме того, образуются летучие органические кислоты, а также некоторые альдегиды и кетоны, участвующие в формировании вкуса и аромата хлеба.

Заключительным этапом приготовления хлеба является его выпечка. Под воздействием высокой температуры происходит изменение коллоидного состояния основных полимерных компонентов муки, осуществляются биохимические процессы взаимодействия различных веществ и процессы чисто физического характера. Технологическое назначение выпечки заключается в закреплении пористой структуры хлеба, достигнутой в процессе сбраживания, и в формировании вкуса и аромата хлеба, а также цвета корки.

Наиболее интенсивно биохимические процессы протекают в интервале температур 43-60°C. Происходят глубокие изменения в структуре крахмальных зерен: в результате совместного действия α - и β -амилаз на клейстеризующийся крахмал или только β -амилазы (тесто из нормальной пшеничной муки) повышается содержание водорастворимой фракции в мякише выпеченного хлеба, увеличивается также содержание растворимого в воде белка вследствие повышения атакруемости протеолитическими ферментами.

При дальнейшем повышении температуры происходит свертывание белковых веществ клейковины и клейстеризация крахмала, превращающегося в прочный студень, закрепляется пористая структура теста и формируется мякиш хлеба. В процессе выпечки заметно снижается титруемая кислотность продукта. На поверхности выпекаемых тестовых заготовок протекают биохимические процессы, существенно влияющие на качество продукта. Установлено, что под воздействием высокой температуры на поверхности хлеба происходит взаимодействие восстанавливающих сахаров с аминокислотами, в результате чего образуются различные карбонильные

соединения и темнокрашенные продукты - меланоидины. Меланоидины и придают готовому продукту соответствующую окраску. Изменение цвета поверхности хлеба от светло-желтого до темно-коричневого происходит в интервале температур 130-170°C, при температуре выше 170-175°C корка хлеба начинает обугливаться.

Качество хлеба оценивается по следующим показателям:

1) внешний вид и цвет корки - корка должна быть румяная, поджаристая, не пригорелая, но и не бледная;

2) кислотность - хлеб должен удовлетворять определенным нормам стандарта по кислотности;

3) качество мякиша, структура пористости. Существует определенная шкала пористости, по которой определяют качество хлеба. Она должна быть достаточно равномерной. Важным показателем качества хлеба является эластичность мякиша, его заминаемость. Если мякиш заминается или он недостаточно эластичен - хлеб плохой;

4) влажность мякиша. Это очень важный показатель. Влажность мякиша должна соответствовать определенным нормам стандарта.

5) объем хлеба - чем объем хлеба больше, тем он пористее, тем лучше пропитывается пищеварительными соками и, следовательно, лучше усваивается организмом. Для подового хлеба, то есть для хлеба, который выпекается не в форме, а на поду, большое значение имеет отношение высоты хлеба к его диаметру (Н/Д). Если мука плохая и хлеб получается низкий, то отношение высоты к диаметру будет очень низким;

6) вкус и аромат хлеба - аромат хлеба зависит от очень сложного комплекса различных веществ, образующихся в процессе брожения теста и в процессе выпечки хлеба. Этот комплекс включает в себя различные альдегиды, органические кислоты и сложные эфиры. Особенно важную роль играют альдегиды, в первую очередь, фурфурол и оксиметилфурфурол.

9.1 Лабораторная работа №14. Пробная выпечка

Пробная выпечка дает полную оценку хлебопекарных свойств муки. При пробной выпечке выявляется водопоглотительная способность муки (способность поглощать определенное количество воды при замесе теста), а также поведение теста при брожении, физические свойства теста, весовой и объемный выход хлеба, пористость, цвет корки и мякиша хлеба и другие показатели.

Водопоглотительная способность муки определяется следующим способом: из образца муки выделяется навеска 50 г и помещается в круглодонную фарфоровую чашку. Из бюретки постепенно небольшими порциями приливают воду комнатной температуры и замешивают тесто. Вначале замес ведется шпателем, затем, после образования теста, руками. Добавление воды прекращается, когда тесто приобретает надлежащую консистенцию и не липнет к рукам. Водопоглотительную способность муки

выражают в процентах.

Тесто для пробной выпечки готовят безопасным способом.

Рецептура: мука - 100 г;
дрожжи прессованные - 3,5 г;
соль – 2,5 г;
вода - по расчету

Начальная температура теста должна быть 32°C. Количество воды для замеса теста определяется по формуле:

$$K = \frac{A \cdot B}{100},$$

где А - масса муки в граммах при влажности 14,0 %;

В - водопоглотительная способность муки, %

(водопоглотительная способность принимается равной 60 %)

При замесе теста отмечают его физические свойства, характеризуя их терминами: сухое, эластичное, липкое. Замешанное тесто помещают в термостат, в котором поддерживается температура 32°C.

Общая продолжительность брожения 160 минут. Обминка (перебивка) теста при использовании муки высшего и первого сортов производится два раза - через 60 и 120 минут после начала брожения. После 160 минут брожения тесто формуют, помещают в предварительно смазанные формы и ставят в термостат для расстойки при температуре 32°C.

Момент окончания расстойки определяют по состоянию и виду поверхности теста. Полностью расстаявшееся тесто начинает опадать и поверхность его становится более плоской. Расстойку необходимо прекращать до этого. Длительность расстойки выражают в минутах. Выпечка хлебцев ведется при температуре 225-230°C в течение 30-35 минут. По окончании выпечки верхняя корка хлеба слегка смачивается водой.

Анализ качества полученного хлеба

Качество хлеба оценивается после остывания, но не ранее, чем через 4 часа и не позднее, чем через 16 часов после выпечки.

Определяются: масса и объем хлеба, правильность и симметричность формы, цвет и состояние корки, эластичность и пористость мякиша, вкус, запах и отсутствие хруста при разжевывании. Цвет корки характеризуется как "бледная", "золотисто-желтая", "светло-коричневая". Состояние поверхности корки характеризуется как "гладкая" или "неровная", "с трещинами" или "подрывами". Объем хлеба измеряют следующим образом:

в специальную цилиндрическую емкость с гладкими краями насыпают мелкое просо. Плотно прижимая линейку к краям цилиндра, удаляют избыток

проса. Затем просо из цилиндра пересыпают в другую тару, а в цилиндр помещают выпеченный хлеб. Хлеб сверху засыпают отсыпанным просом, при этом оно заполняет незанятое хлебом пространство, поверхность проса выравнивается также при помощи линейки. Затем измеряют объем не вошедшего в цилиндр проса - он будет равен объему хлеба.

Отмечается цвет мякиша, его эластичность, определяемая легким нажатием пальцев. Характер пористости оценивается по крупности и равномерности пор и толщине их стенок. Отсутствие хруста при разжевывании хлеба должно свидетельствовать об отсутствии минеральных примесей.

Припек определяется по формуле:

$$X = \frac{C - A}{A} \cdot 100,$$

где С - масса хлеба, г;

А - масса муки, г.

Рассчитывается объемный выход хлеба, то есть объем хлебца, отнесенный к 100 г муки, израсходованной на его приготовление.

9.2 Вопросы к защите лабораторной работы №14

- 1) Какие Вы знаете хлебопекарные качества муки?
- 2) От чего зависит газообразующая способность муки?
- 3) От чего зависит газодерживающая способность муки?
- 4) Что оказывает влияние на водопоглотительную способность муки?
- 5) Какие биохимические процессы протекают при замесе теста и его расстойке?
- 6) Какие биохимические процессы протекают при выпечке хлеба?
- 7) Какие Вы знаете показатели качества хлеба?
- 8) От чего зависит цвет корочки хлеба?
- 9) Что влияет на объем хлеба?
- 10) За счет чего изменяется влажность мякиша?
- 11) От чего зависит аромат хлеба?
- 12) Что такое "припек"?
- 13) Как формируется мякиш хлеба?

9.4.Лабораторная работа №15. Изучение влияния улучшителей, а также различных пищевых добавок на выход и качество кондитерских изделий (УИРС)

Для приготовления мучных кондитерских изделий применяются разнообразные продукты: мука, сахаристые изделия (сахар-песок, сахарная пудра), жиры (маргарин, растительное масло), молочные продукты (натуральное молоко, сухое молоко, сливки, сметана, творог, масло, яичные продукты (яйца, яичный порошок), различные наполнители (орехи, мак, повидло), вкусовые, ароматические вещества (ванилин, гвоздика, корица, тмин и др.), пищевые красители.

Результаты выполнения работы отражаются в написании реферата или итогового отчета, в котором дается биохимическое обоснование использования рецептурных продуктов, а также их влияния на выход и качество готового изделия.

10 Литература, рекомендуемая для изучения дисциплины

Основная

- 1 Казаков Е.Д., Кретович В.Л. Биохимия зерна и продуктов его переработки.-М.:Агропромиздат,1989.- 368 с.
- 2 Плешков Б.П. Биохимия сельскохозяйственных растений.-М.:Агропромиздат,1987.- 494 с.
- 3 Кретович В.Л. Биохимия растений.-М.: Высшая школа,1986.- 448 с.
- 4 Щербаков В.Г., Лобанов В.Г. и др. Биохимия растительного сырья.-М.: Колос, 1999.- 376 с.
- 5 Филиппович Ю.Б. Основы биохимии.-М.: Агар, 1999.- 512 с.
- 6 Козьмина Н.П. Биохимия зерна и продуктов его переработки.-М.: Колос,1976.- 376 с.
- 7 Булгаков Н.И. Биохимия солода и пива.-М.: Пищевая промышленность, 1976.- 358 с.
- 8 Хорунжина С.И. Биохимические и физико-химические основы технологии солода и пива.-М.: Колос, 1999.- 312 с.

Дополнительная

- 1 Кретович В.Л. Введение в энзимологию.-М.: Наука, 1967.- 184 с.
- 2 Комаров О.С., Терентьев А.А. Химия белка.-М.: Просвещение, 1984.- 232 с.
- 3 Вакар А.Б. Клейковина пшеницы.-М.: Издательство АН СССР, 1961.- 220 с.
- 4 Нечаев А.П., Сандлер Ж.Я. Липиды зерна.-М.: Колос, 1975.- 187 с.
- 5 Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов. Моносахариды.-М.: Высшая школа, 1977.- 222 с.
- 6 Нечаев А.П., Ерёменко Т.В. Органическая химия.-М.: Высшая школа, 1985.- 464 с.
- 7 Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов. Полисахариды.-М.: Высшая школа, 1977.- 224 с.
- 8 Ауэрман Л.Я. Технология хлебопекарного производства.-СПб.: Профессия, 2003.- 416 с.
- 9 Технология солода, пива и безалкогольных напитков.-М.: Колос, 1992.- 446 с.
- 10 Кенгис Р.П., Мархель П.С. Домашнее приготовление тортов, пирожных, печенья, пряников, пирогов.-М.:Пищевая промышленность, 1974 (и более поздние годы изданий)
- 11 Книги по кулинарии и выпечке кондитерских изделий (на выбор студентов)

Список использованных источников

- 1 Методы биохимического исследования растений: Сборник / Под ред. А.И. Ермакова.-М.: Колос, 1986.- 325 с.
- 2 Филиппович Ю.Б. и др. Практикум по общей биохимии.-М.: Просвещение, 1982.- 311 с.
- 3 Плешков Б.П., Практикум по биохимии растений.-М.: Колос, 1985.- 255 с.
- 4 Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов.- Воронеж: Воронежская гос. технол. академия, 2002.- 408 с.