

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»**

С. В. АГАФОНОВА, Е. С. ЗЕМЛЯКОВА

БИОКОНВЕРСИЯ И БИОКАТАЛИЗ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Утверждено редакционно-издательским советом ФГБОУ ВО «КГТУ»
в качестве учебно-методического пособия по лабораторным работам
для студентов магистратуры
по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология»
(профиль подготовки – «Пищевая биотехнология»)

Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2022

УДК 663/664

Рецензент:

профессор, д-р техн. наук, зав. кафедрой пищевой биотехнологии
ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»
О. Я. Мезенова

Агафонова, С. В., Землякова, Е. С.

Биоконверсия и биокатализ в пищевой биотехнологии: учеб.-метод. пособие по лабораторным работам для студентов магистратуры по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология» (профиль «Пищевая биотехнология») по дисциплине «Биоконверсия и биокатализ в пищевой биотехнологии» / С. В. Агафонова, Е. С. Землякова. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», 2022. – 75 с.

Учебно-методическое пособие содержит методические указания по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Биоконверсия и биокатализ в пищевой биотехнологии». Лабораторные работы посвящены изучению процессов биокатализа и биоконверсии при производстве пищевых продуктов, основных принципов применения ферментных препаратов в пищевой биотехнологии.

Рис. – 12, табл. – 16, список лит. – 17 наименований

Учебное пособие рассмотрено и одобрено кафедрой пищевой биотехнологии 17 мая 2022 г., протокол № 9

Учебное пособие рассмотрено и одобрено методической комиссией учебного совета института агроинженерии и пищевых систем 15 июня 2022 г., протокол № 7

УДК 663/664

© Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Калининградский государственный
технический университет», 2022 г.
© Агафонова С. В., Землякова Е. С.,
2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
<i>Лабораторная работа № 1</i> Выделение ферментов из солода, определение их активности, факторов активации и ингибирования.....	6
<i>Лабораторная работа № 2</i> Биоконверсия крахмала. Получение крахмальной патоки	16
<i>Лабораторная работа № 3</i> Биоконверсия крахмалсодержащего сырья. Получение этилового спирта.....	31
<i>Лабораторная работа № 4</i> Биоконверсия белков рыбного сырья. Получение белковых гидролизатов.....	44
<i>Лабораторная работа № 5</i> Биоконверсия некрахмалистых углеводов растительного сырья	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	68
ПРИЛОЖЕНИЯ	70

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для студентов магистратуры, обучающихся по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология» (профиль «Пищевая биотехнология»), выполняющих лабораторные работы по дисциплине «Биоконверсия и биокатализ в пищевой биотехнологии». Знания, приобретенные по данной дисциплине, являются базовыми при подготовке биотехнологов, ориентированных на профессиональную деятельность в пищевой промышленности.

В результате освоения знаний по представленному разделу дисциплины обучающийся должен:

- освоить общие принципы и отдельные стадии биоконверсии пищевого сырья; фундаментальные разделы технологии биоконверсии пищевого сырья для понимания основных закономерностей различных процессов, происходящих при биоконверсии; основные группы ферментов, используемые в процессе биоконверсии;

- приобрести навыки использования и применения ферментов в технологии биоконверсии пищевого сырья;

- сформировать базовые знания, умения и навыки в области биоконверсии пищевого сырья для управления процессом производства продуктов биотехнологии на основе превращений основных структурных компонентов.

Представленные лабораторные работы являются важной частью дисциплины «Биоконверсия и биокатализ в пищевой биотехнологии». Их выполнение позволит обучающимся приобрести необходимые знания и навыки для практической деятельности.

Результатами освоения дисциплины «Биоконверсия и биокатализ в пищевой биотехнологии» являются следующие компетенции:

- готовность к планированию, организации и проведению научно-исследовательских работ в области биотехнологии, способность проводить корректную обработку результатов экспериментов и делать обоснованные заключения и выводы;

- способность проводить анализ научной и технической информации в области биотехнологии и смежных дисциплин с целью научной, патентной и маркетинговой поддержки проводимых фундаментальных исследований и технологических разработок.

Отчеты о выполнении лабораторных работ формируются студентами в рабочей тетради. Отчет должен включать:

- название лабораторной работы;

- цель;
- порядок действий при проведении каждого опыта (ход работы), формулы для расчета;
- таблицы и рисунки с полученными в ходе лабораторной работы данными;
- вывод по лабораторной работе.

Преподаватель проверяет усвоение студентами теоретического материала, знание методов анализа, оценивает уровень оформления работы и при его соответствии подписывает отчет. Лабораторные работы должны выполняться с соблюдением требований техники безопасности при работе в химической лаборатории.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ИЗ СОЛОДА, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ, ФАКТОРОВ АКТИВАЦИИ И ИНГИБИРОВАНИЯ (4 Ч)

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по выделению ферментов из растительного сырья, определению их активности, факторов активации и ингибирования.

Задания:

- 1) освоить теоретический материал, представленный в разделе 1.2;
- 2) выделить α - и β -амилазы из солода;
- 3) определить активность амилаз солода по массе гидролизованного крахмала;
- 4) определить активность амилаз солода по Вольгемуту;
- 5) установить активирующее и ингибирующее действие солей на амилазы солода.

1.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Приборы и оборудование: лабораторная баня; термостат; фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; термометр; рН-метр; пробирки; штативы; шпатель; конические колбы вместимостью 50 см³; мерные колбы объемом 50 мл; пипетки стеклянные градуированные объемом 2 и 1 см³; пипетки Пастера; мерные цилиндры.

Материалы и реактивы: вода дистиллированная; вытяжка из солода (по приложению А); ацетатный буфер рН 5,5 (по приложению А); раствор с массовой долей крахмала 2 %; раствор с массовой долей крахмала 1 %; раствор с концентрацией соляной кислоты 1 моль/дм³; раствор с массовой долей йода 0,3 % в растворе с массовой долей йодида калия 3 % (по приложению А); ацетат кальция; раствор гидрофосфата кальция 0,15 моль/дм³; раствор с массовой долей серной кислоты 10 %; раствор с массовой долей хлорида натрия 1%; раствор с массовой долей сульфата меди 1%.

1 Выделение α -амилазы из солода

Ход работы. В пробирку вносят 5 см³ солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют на кончике ножа порошок ацетата кальция и пробирку выдерживают в течении 15 мин на водяной бане при 68 °С (температура воды не должна подниматься выше 70 °С и опускаться ниже 66 °С). За-

тем содержимое пробирки охлаждают под проточной холодной водой. При таком прогревании β -амилаза полностью инактивируется, а α -амилаза сохраняет свою активность. Полученный раствор используют для определения активности α -амилазы.

2 Выделение β -амилазы

Ход работы. В колбу вместимостью 50 см³ вносят 5 см³ солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют 4 см³ воды, 1 см³ раствора с концентрацией соляной кислоты равной 0,1 моль/дм³ (рН полученной смеси должен быть равен 3,3 по рН-метру). Затем колбу с содержимым помещают на 15 мин в морозильную камеру. В этих условиях α -амилаза полностью инактивируется, а β -амилаза сохраняет свою активность. По истечении 15 мин выдержки на холоде содержимое колбы доводят до рН 6,0, прибавляя к содержимому 2 см³ раствора с концентрацией гидрофосфата натрия (Na₂HPO₄) 0,15 моль/дм³. Полученный раствор используют для определения активности β -амилазы.

3 Определение активности амилаз солода по массе гидролизованного крахмала

Ход работы. Для проведения опыта берут шесть пробирок, одна из них является контрольной. Пробирки маркируют и заполняют в соответствии с таблицей 1.1.

Таблица 1.1 – Определение активности амилаз солода

№ п/п	Компоненты, мл	Номер пробирки					
		1	2	3	4	5	6
1	Вытяжка из солода	-	0,1	0,2	-	-	-
2	α -Амилаза	-	-	-	0,2	0,4	-
3	β -Амилаза	-	-	-	-	-	1,0
4	Вода	1,0	0,9	0,8	0,8	0,6	-
5	Буфер, рН 5,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
6	Крахмал, 2%	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	Разбавление, R	-	10	5	5	2,5	2,4

Содержимое пробирок перемешивают и помещают в термостат при 37–38 °С на 30 мин. Такая постановка опыта позволяет одновременно определить суммарную активность амилаз в солодовой вытяжке (α - и β -амилаз вместе), активность α -амилазы и активность β -амилазы. По окончании времени ин-

кубации пробирки из термостата вынимают и в каждую немедленно добавляют по 2 см³ раствора с концентрацией соляной кислоты 1 моль/дм³ и по три капли водного раствора йода; содержимое перемешивают.

Пробирки с содержимым, окрашенным в желтые тона, убирают. Пробирки с содержимым, окрашенным в синие, фиолетовые или красные тона оставляют для дальнейшей работы (если после добавления раствора йода все пробирки с одним и тем же ферментным препаратом будут окрашены в желтый цвет, то опыт следует повторить, взяв этот ферментный препарат в меньшем количестве).

Берут мерные колбы вместимостью 50 см³, маркируют их соответственно номерам, оставленных для дальнейшей работы пробирок. В каждую колбу вносят 30–40 см³ воды, 0,5 см³ раствора с концентрацией соляной кислоты 1 моль/дм³, 10 капель водного раствора йода и 0,5 см³ смеси из пробирки в соответствии с номером колбы. Непосредственно перед отбором смеси содержимое пробирки перемешивают. Содержимое колбы доводят до метки водой, перемешивают и колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре (длина волны 656 нм) против дистиллированной воды.

Активность амилаз выражают в мг расщепленного крахмала на 1 г солода (или другого материала) за 1 мин. Расчет производят следующим образом:

- определяют массу расщепленного крахмала по формуле (1.1):

$$m = \frac{E_k - E_o}{E_k} \cdot C, \quad (1.1)$$

где m – масса расщепленного крахмала за время опыта, мг; E_k – оптическая плотность контрольного раствора; E_o – оптическая плотность опытного раствора; C – масса внесенного крахмала, мг (3 мл раствора с массовой долей крахмала 2 % содержат 60 мг крахмала);

- полученный результат умножают на разбавление (см. табл. 1.1), т.е. приводят к 1 см³ исходной ферментной вытяжки и затем делят на время инкубации (30 мин), что позволяет выразить активность амилазы в мг расщепленного крахмала 1 см³ ферментной вытяжки за 1 мин.

Зная методику приготовления вытяжки из биологического объекта, можно легко рассчитать активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1 г биологического материала за 1 мин по формуле (1.2):

$$A = \frac{(E_k - E_o) \cdot 60 \cdot V}{E_k \cdot V_1 \cdot m \cdot 30}, \quad (1.2)$$

где A – активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1 г солода (или другого материала) за 1 мин; E_k – оптическая плотность контрольного раствора; E_o – оптическая плотность опытного раствора; 60 – масса взятого для анализа крахмала, мг; V – общий объем вытяжки, полученной из солода (100 см^3); V_1 – объем ферментного препарата, взятого для инкубирования, см^3 ; 30 – время инкубации, мин; m – масса расщепленного крахмала за время опыта, мг.

При расчете активности β -амилазы полученный по формуле (1.2) результат необходимо умножить на коэффициент 2,4, который учитывает все разведения солодовой вытяжки, сделанные при выделении β -амилазы.

Результаты исследований записывают и делают выводы об активности амилаз солода.

4 Определение активности амилаз солода по Вольгемуту

Метод основан на нахождении максимального разведения жидкости, содержащей амилазу (вытяжка из солода, слюна, молоко, сыворотка крови и др.), при котором в стандартных условиях происходит полное расщепление определенного количества крахмала.

Ход работы. В штатив устанавливают и маркируют семь пробирок и в каждую вносят по 1 см^3 воды. Затем в первую пробирку добавляют 1 см^3 вытяжки из солода, тщательно перемешивают и 1 см^3 смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Содержимое тщательно перемешивают и 1 см^3 смеси из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней пробирки 1 см^3 смеси после перемешивания выливают. Таким образом, получается ряд разведений, в котором содержание солодовой вытяжки в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей.

После этого в каждую пробирку вносят по 2 см^3 раствора с массовой долей крахмала 1 % и содержимое перемешивают встряхиванием. Все пробирки помещают в термостат при $37\text{--}38 \text{ }^\circ\text{C}$ на 30 мин. По окончании инкубации в каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора с массовой долей серной кислоты 10 % (для остановки реакции) и по три капли водного раствора йода. Результат опыта вносят в таблицу 1.2, обозначая окраску первыми буквами образовавшегося цвета раствора.

Таблица 1.2 – Окраска проб с йодом после инкубации

Показатель	Номера пробирок и доля солодовой вытяжки в содержимом, мл						
	1	2	3	4	5	6	7
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Окраска раствора							

Отмечают, в каких пробирках произошел полный гидролиз крахмала (желтое окрашивание с йодом) и по последней из них рассчитывают активность амилазы (амилазное число). Допустим, полный гидролиз взятого для опыта крахмала произошел в пробирках 1, 2, 3 и 4, следовательно, активность амилазы нужно считать по пробирке 4, в которой доля солодовой вытяжки составляет $1/16 \text{ см}^3$. Пересчитав объем расщепленного крахмала на 1 см^3 солодовой вытяжки, получим число 32. Это означает, что 1 см^3 неразбавленной солодовой вытяжки в таких же условиях может расщепить 32 см^3 раствора с массовой долей крахмала 1 %, т.е. амилазное число составляет 32.

При определении амилазной активности молока кратность разведения уменьшают в 8–10 раз, время инкубации увеличивают до 60 мин, для исследования применяют раствор с массовой долей крахмала 0,1 %.

5 Определение активатора и ингибитора работы фермента

Ход работы. В качестве источника фермента используют для работы вытяжку из солода.

В штативе располагают тремя рядами 18 пробирок (шесть пробирок в каждом ряду). Пробирки каждого ряда нумеруют и во все вносят по 1 см^3 воды. Затем в первую пробирку каждого ряда добавляют по 1 см^3 вытяжки из солода, содержимое хорошо перемешивают. Далее производят разбавление фермента так же, как в опыте № 4.

После разбавления во все пробирки первого ряда наливают по 1 см^3 воды (контрольный ряд), в пробирки второго ряда – по 1 см^3 раствора с массовой долей хлорида натрия 1 % и в пробирки 3-го ряда – по 1 см^3 раствора с массовой долей сульфата меди 1 %. Затем во все пробирки приливают по 1 см^3 раствора с массовой долей крахмала 1 % в следующем порядке: сначала в первые пробирки всех рядов, после этого во вторые пробирки всех рядов и т. д. Содержимое перемешивают встряхиванием и штатив с пробирками ставят в термостат при $37\text{--}38 \text{ }^\circ\text{C}$ на 30 мин. По окончании инкубации в пробирки каждого ряда добавляют по 1 см^3 раствора с массовой долей серной (или соляной) кислоты 10 % и по три капли раствора йода в том же порядке, в каком приливался раствор

крахмала. Содержимое перемешивают и отмечают в каждом ряду номер пробирки, в которой реакция на крахмал отрицательная (желтое окрашивание). Результаты опыта заносят в таблицу, обозначив желтые тона буквой «Ж», красные (красно-коричневые) – «К», фиолетовые – «Ф» и синие – «С».

Таблица 1.3 – Окраска проб с йодом после инкубации

Компоненты	Номера пробирок и доля вытяжки из солода в содержимом, мл					
	1	2	3	4	5	6
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Вода						
Хлорид натрия						
Сульфат меди						

Определяют активатор и ингибитор. Разделив степень разведения контрольной пробы (первый ряд), в которой реакция с йодом отрицательная, на степень разведения проб, давших отрицательную реакцию с исследуемыми веществами, находят, во сколько раз активатор или ингибитор стимулирует или тормозит действие амилазы. При высокой активности амилазы солода число пробирок в опыте увеличивают до 7–8.

1.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Источником для получения ферментов служат различные биологические объекты: свежие и свежемороженые животные и растительные ткани, семена растений, биологические жидкости, микроорганизмы. Извлекают ферменты из этих объектов посредством экстрагирования водой, водными растворами глицерина, нейтральных солей, буферными растворами при одновременном механическом разрушении клеточных структур. Выделяют ферменты при температуре близкой к нулю. Хранят растворы ферментов только в холодильнике, причем и в этих условиях они быстро теряют активность.

В связи с тем, что процедура выделения индивидуальных ферментов чрезвычайно сложна, работу часто проводят с так называемыми ферментными препаратами, представляющими собой частично очищенные ферменты или вытяжки из биологических объектов.

Пророщенные зерна ячменя пшеницы и других злаковых растений обладают высокой амилазной активностью. Амилазы (3.2.1) – ферменты, катализи-

рующие гидролиз крахмала и родственных полисахаридов, относятся к классу гидролаз (3), подклассу гликозидаз (3.2.), подподклассу D-гликозидаз (3.2.1). Амилазы гидролизуют как, неизмененные крахмальные зерна, так и оклейстеризованный крахмал. Причем, действие амилаз на оклейстеризованный крахмал значительно эффективнее, чем на неизмененные зерна, поэтому в спиртовой промышленности, перед осахариванием крахмала солодом производят заваривание муки или картофеля.

По свойствам, распространению в природе и способу действия на крахмал различают: α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу и амилопектин-1,6-глюканогидролазу.

α -Амилаза (КФ. 3.2.1.1) – систематическое название 1,4- α -D-глюкан-глюканогидролаза, старые названия – диастаза, пталин, гликогеназа, декстриногенамилаза. Этот фермент содержится в слюне, соке поджелудочной железы, плесневых грибах, проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя. Обнаружена активность α -амилазы в не проросших семенах ржи и сорго.

α -Амилаза катализирует без определенного порядка гидролиз внутренних 1,4- α -гликозидных связей в полисахаридах, содержащих три и более остатков α -D-глюкозы. При действии α -амилазы на крахмал образуются главным образом декстрины небольшой молекулярной массы и незначительное количество мальтозы.

α -Амилаза чувствительна к подкислению (оптимум pH 5,6–6,3), но термостабильна (температурный оптимум 65 °C).

При высокой α -амилазной активности пшеничной муки (обычно полученной из проросшего зерна пшеницы и ржи в тесте происходит накопление декстринов, (декстрины не сбрасываются дрожжами), что приводит к ухудшению качества хлеба – его пористости, физических свойств мякиша, вкуса.

β -Амилаза (КФ 3.2.1.2), систематическое название 1,4- α -D-глюкан-мальтогидролаза, старые названия – диастаза, сахарогенамилаза, гликогеназа. Этот фермент содержится в непроросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя, соевых бобах. Он катализирует гидролиз 1,4- α -гликозидных связей в полисахаридах, последовательно отщепляя остатки мальтозы от нередуцирующих концов цепей. β -Амилаза расщепляет амилозу полностью до мальтозы. Амилопектин она гидролизует с образованием мальтозы и декстринов, дающих коричнево-красное окрашивание с йодом (декстрины более высокой молекулярной массы по сравнению с декстринами, образующимися при действии α -амилазы). Действие β -амилазы прекращается в точках ветвления молекулы амилопектина.

β -Амилаза более активна в кислой среде (оптимум pH 4,8), но термолабильна (температурный оптимум 51 °C). Этот фермент способствует накоплению мальтозы в тесте, что приводит к более интенсивному брожению.

Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3) или экзо-1,4- α -D-глюкозидаза имеет систематическое название 1,4- α -D-глюкан-глюкогидролаза. Она гидролизует крахмал с образованием преимущественно глюкозы и небольшого количества декстринов. Препараты глюкоамилазы получают из плесневых грибов. С помощью этого фермента получают из крахмала глюкозную патоку и кристаллическую глюкозу.

Амилопектин-1,6-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.41) подвергает гидролизу 1,6- α -гликозидные связи в амилопектине, гликогене.

Выделение α - и β -амилазы из солодовой водной вытяжки основано на различной устойчивости этих ферментов к температуре и рН среды. При нагревании солодовой вытяжки до 70 °С β -амилаза денатурирует, тогда как α -амилаза при этой температуре сохраняет нативную конформацию и активность. Оптимум действия β -амилазы проявляется при рН 4,8, однако α -амилаза при таких значениях рН теряет свою активность, а при понижении до рН 3,3 – денатурирует.

Действие амилаз на крахмал можно установить либо по убыли крахмала, либо по накоплению продуктов его распада – сахара.

Метод определения активности амилаз по массе расщепленного крахмала получил название колориметрического.

Принцип метода состоит в том, что активность амилаз рассчитывают по разности между массами взятого для опыта и оставшегося по окончании опыта нерасщепленным крахмала, определяемого фотометрическим анализом по цветной реакции с йодом. При проведении опыта продолжительность инкубации и объем раствора ферментного препарата устанавливают такими, чтобы в опытных пробирках (содержащих фермент) не произошел полный гидролиз крахмала.

Данный метод позволяет установить специфичность и активность совместного действия амилаз на крахмал. α -Амилаза (КФ 3.2.1.1) гидролизует в крахмале и родственных полисахаридах α -1,4-гликозидные связи без определенного порядка. В результате образуются декстрины и незначительное количество мальтозы. β -Амилаза (КФ 3.2.1.2) гидролизует в крахмале и родственных полисахаридах α -1,4-гликозидные связи, последовательно отщепляя молекулы мальтозы с нередуцирующих концов цепочек.

Наиболее эффективно гидролиз осуществляется под действием комплекса амилаз, содержащихся в вытяжке из солода.

Активность ферментов, помимо температуры и рН, в значительной степени зависит от наличия и концентрации в реакционной среде некоторых ионов и соединений. Одни из них усиливают активность ферментов – активаторы, другие действуют угнетающе – ингибиторы. Одни из регуляторов – активаторы, присоединяясь к молекуле неактивного или малоактивного фермента, уве-

личивают активность до максимальной. Эту функцию часто выполняют ионы металлов: калия, кальция, магния, цинка, меди, железа, марганца, кобальта и анион хлора. Ряд протеиназ (катепсины, папаин), аргиназа активируются молекулами цистеина, восстановленного глутатиона, имеющих свободную HS-группу.

Наращение активности ферментов под действием металлов объясняется тем, что в одних случаях ионы металлов выполняют роль кофакторов, в других – облегчают образование фермент-субстратного комплекса, в третьих – способствуют присоединению кофермента к апоферменту, в четвертых обеспечивают стабилизацию третичной и четвертичной структуры фермента.

Вещества, вызывающие частичное или полное торможение ферментных реакций, называют ингибиторами. К таким веществам относятся соли и ионы тяжелых металлов, дубильные вещества и др.

Ключевые (регуляторные) ферменты имеют аллостерический центр для присоединения активаторов и ингибиторов, которые, присоединившись, вызывают обратимое изменение в структуре активного центра. Аллостерические ферменты выполняют важную роль в регуляции процессов метаболизма. Установлено, роль активаторов чаще всего в этом случае выполняют молекулы собственного субстрата, когда их концентрация в среде достигает определенного уровня, а также АМФ и некоторые гормоны. В ряду ингибиторов для этих ферментов обнаружены неорганические соли, некоторые гормоны, конечный или промежуточный продукт многостадийного процесса распада или синтеза часто служит аллостерическим ингибитором одной из первых реакций (так называемое ингибирование по типу обратной связи).

Контрольные вопросы

- 1) Какие ферменты содержатся в солоде и как их можно выделить?
- 2) На чем основана техника выделения α -амилазы?
- 3) На чем основана техника выделения β -амилазы?
- 4) Какой специфичностью действия и активностью характеризуется α -амилаза?
- 5) Какой специфичностью действия и активностью характеризуется β -амилаза?
- 6) Что лежит в основе колориметрического метода определения активности амилаз?
- 7) Каким образом рассчитывается активность амилаз по колориметрическому методу?

8) В чем заключается метод определения активности амилазы по Вольгемуту?

9) Каким образом готовятся разведения растворов амилаз для метода Вольгемута?

10) Как определить максимальное разбавление амилазы, осуществившей полный гидролиз крахмала?

11) Каким образом рассчитывается активность амилаз по методу Вольгемута?

12) Какие вещества выступают в роли активаторов и ингибиторов работы ферментов?

13) Что такое аллостерический центр фермента?

**БИОКОНВЕРСИЯ КРАХМАЛА.
ПОЛУЧЕНИЕ КРАХМАЛЬНОЙ ПАТОКИ (4 Ч)**

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по проведению биоконверсии крахмала для получения крахмальной патоки.

Задания:

- 1) освоить теоретический материал, представленный в разделе 2.2;
- 2) осуществить биоконверсию крахмала в присутствии различных катализаторов;
- 3) получить крахмальную патоку;
- 4) исследовать показатели качества крахмальной патоки (содержание сухих веществ, содержание редуцирующих веществ; кислотность; температура карамельной пробы).

**2.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ
ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

Приборы и оборудование: термометр; рН-метр; вакуумный насос; рефрактометр; фарфоровые чашки; стеклянные палочки; мерные цилиндры объемом 100 и 50 см³; колбы конические вместимостью 500 см³; пипетки градуированные на 2 и 10 см³; пробки; обратный холодильник; баня водяная; стеклянные пробирки; колба Бунзена; воронка Бюхнера; мерные колбы на 250 и 100 см³; медный тазик или небольшая кастрюлька из нержавеющей стали; керамическая плитка.

Материалы и реактивы: вода дистиллированная; крахмал картофельный; серная кислота (плотность 1,84 г/см³); ферментные препараты амиласубтилин и глюкаваморин; реактив Люголя; раствор с массовой долей гидроксида натрия 10 %; раствор с массовой долей сульфата меди 5 %; карбонат кальция; 0,1 н раствор йода; 0,1 н раствор гидроксида натрия; 1 н раствор серной кислоты; 0,1 н раствор тиосульфата натрия; раствор с массовой долей крахмала 1 %; фильтровальная бумага.

1 Сравнение различных способов гидролиза крахмала

Сравнивают интенсивность гидролиза крахмала при использовании кислотного катализатора и ферментных препаратов амилолитического действия.

Ход работы. 20 г картофельного крахмала отвешивают с точностью до 0,1 г в фарфоровой чашке и размешивают его стеклянной палочкой с 60 см³ во-

допроводной воды. В колбу на 500 см³ наливают 100 см³ воды и добавляют катализатор. При проведении кислотного гидролиза в качестве катализатора добавляют 2 см³ концентрированной серной кислоты (плотность 1,84 г/см³). При проведении ферментативного гидролиза добавляют ферментный препарат глюкокаваморин, ферментный препарат амилоусубтилин. Дозировка ферментных препаратов рассчитывается в зависимости от проявляемой ими активности (*по приложению В*).

Колбу с водой и катализатором закрывают пробкой и помещают на водяную баню. Содержимое колбы нагревают до 80–85 °С в случае кислотного гидролиза и до 52–55 °С в случае ферментативного гидролиза. После этого в колбу тонкой струей вливают крахмальную взвесь, непрерывно помешивая содержимое. Остаток крахмала в чашке ополаскивают 30 см³ воды и также выливают в колбу.

Колбу с кислотным катализатором закрывают пробкой с обратным холодильником и ведут гидролиз на водяной бане при температуре 80–85 °С. Колбы с ферментными препаратами закрывают пробками и ведут гидролиз на водяной бане при температуре 52–55 °С. При работе с ферментными препаратами необходимо постоянно контролировать температуру и не допускать перегревания водяной бани. В противном случае возможна инактивация ферментов. Содержимое колб периодически перемешивают.

Для осуществления контроля осахаривания через 30 мин от начала гидролиза и далее через каждые 5 мин из колбы отбирают пробу объемом 2 см³ и помещают в пробирку. Проводят качественную реакцию, прибавляя к содержимому пробирки две капли раствора Люголя. По окраске, появившейся в пробирке, можно сделать вывод о продуктах реакции и активности катализатора. В таблице 2.1 приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом.

Таблица 2.1 – Реакция крахмала и продуктов гидролиза крахмала на реактив Люголя

Крахмал и продукты его гидролиза	Молекулярная масса продуктов гидролиза	Окраска с раствором Люголя
Крахмал	1 млн. и более	Синяя
Амилодекстрины	10 тыс.	Фиолетовая
Эритродекстрины	От 6 до 4 тыс.	Красно-коричневая
Ахродекстрины	3700	Оранжевая
Мальтодекстрины	1000	Желтая
Мальтоза	342	Желтая

К очередной пробе 2 см^3 добавляют 2 мл 10%-ного раствора с гидроксида натрия, при встряхивании по каплям раствор с массовой долей сульфата меди 5 % до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II). Появление желтого окрашивания, переходящего в красное, указывает на наличие восстанавливающих сахаров (глюкозы и фруктозы), которые в щелочной среде восстанавливают гидроксид меди (II) в оксид меди (I), сами при этом окисляются до альдоновых кислот. Гидролиз при этом считают окончанным.

Фиксируют время, за которое окраска с раствором Люголя изменяется в соответствии с таблицей 2.1. Делают вывод об эффективности использования различных катализаторов гидролиза крахмала.

2 Получение крахмальной патоки

Для получения крахмальной патоки используют гидролизаты, изготовленные в опыте 1.

Ход работы. В случае кислотного гидролиза необходимо провести нейтрализацию смеси. Для нейтрализации используют карбонат кальция CaCO_3 . Расчет количества CaCO_3 , необходимого для нейтрализации, ведут по уравнению:



Практически при работе с картофельным крахмалом CaCO_3 берут на 25 % больше рассчитанного количества. Таким образом, на нейтрализацию сиропа необходимо взять 4,68 г CaCO_3 . Навеску размешивают с небольшим количеством воды и осторожно приливают в колбу с гидролизатом. Контроль нейтрализации ведут с помощью рН-метра или индикаторной бумаги. Оптимальный рН, до которого должен быть нейтрализован гидролизат при гидролизе серной кислотой, составляет 4,5–4,6.

В случае ферментативного гидролиза необходимо инактивировать фермент. Этого достигают при нагревании гидролизата до $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Гидролизат охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр под вакуумом, используя колбу Бунзена и воронку Бюхнера.

Полученный фильтрат упаривают до содержания сухих веществ не менее 40 %. Контроль упаривания ведут по рефрактометру.

3 Определение сухих веществ патоки

Ход работы. Для определения сухих веществ патоки используют рефрактометр, позволяющий определять коэффициент рефракции в концентрированных растворах с относительно высоким коэффициентом преломления (до 1,540). Одну-две капли патоки наносят на призму рефрактометра и производят отсчет по шкале сухих веществ.

В случае отсутствия рефрактометра с нужным пределом измерения используют метод определения сухих веществ с предварительным разведением водой. Для этого на аналитических весах взвешивают бюкс со стеклянной палочкой и крышкой, помещают в бюкс 4–6 г патоки. В бюкс с патокой цилиндром или градуированной пипеткой вносят дистиллированную воду в количестве, несколько превышающем (на 2–3 см³) удвоенное количество взятой пробы. Патоку растворяют в открытом бюксе на водяной бане при температуре выше 70 °С, при этом содержимое бюкса перемешивают стеклянной палочкой. Затем, закрыв бюкс крышкой, раствор охлаждают, тщательно вытирают снаружи фильтровальной бумагой и взвешивают бюкс с раствором, палочкой и крышкой.

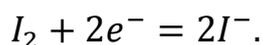
На призму рефрактометра наносят 2–3 капли раствора и отсчитывают показания по шкале прибора при 20 °С. Если температура отличается от 20 °С, то по соответствующей таблице находят поправку. Для определения видимого содержания сухих веществ в патоке умножают массовую долю сухих веществ в растворе патоки на разведение патоки (отношение массы раствора патоки к массе патоки). Для определения истинного содержания сухих веществ в патоке полученное значение умножают на коэффициент пересчета. Этот коэффициент можно найти по массовой доле редуцирующих сахаров в патоке (при определении их йодометрическим методом) или по показанию сахариметра при поляризации основного раствора патоки (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Коэффициенты пересчета сухих веществ

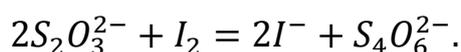
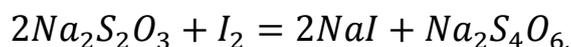
Массовая доля редуцирующих веществ, %	Коэффициент пересчета <i>K</i>
30–34	0,9608
35–44	0,9661
45–50	0,9720
51–55	0,9760
56–60	0,9798

4 Определение массовой доли редуцирующих веществ в крахмальной патоке йодометрическим методом

Йодометрический метод определения редуцирующих веществ (метод Вильштеттера и Шудля) основан на том, что йод в щелочной среде количественно окисляет альдосахара в соответствующие одноосновные кислоты, кето-зы при этом не изменяются. Окислительное действие щелочного раствора йода происходит по схеме:



Избыток йода, не вошедший в реакцию с сахарами, оттитровывают тиосульфатом натрия:



Ход работы. Вначале готовят основной раствор патоки. В стаканчике на аналитических весах взвешивают 50 г патоки. Навеску смывают горячей дистиллированной водой в мерную колбу вместимостью 250 см³. После охлаждения до 20 °С колбу доливают водой до метки и тщательно перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят пипеткой 10 см³ основного раствора патоки, доливают до метки дистиллированной водой и перемешивают. В коническую колбу вместимостью 250–400 см³ пипеткой вносят 10 см³ полученного раствора, 25 см³ 0,1 н раствора йода и из бюретки медленно (по каплям) приливают 30 см³ 0,1 н раствора гидроксида натрия. Содержимое колбы хорошо перемешивают, закрывают пробкой и оставляют на 15–20 мин в темном месте. Затем прибавляют 4,5–5 см³ 1 н раствора серной кислоты, титруют 0,1 н раствором тиосульфата натрия до светло-желтого окрашивания, после чего добавляют 1 см³ 1%-ного раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

Параллельно готовят контрольную пробу. В коническую колбу пипеткой вносят 10 см³ дистиллированной воды, 25 см³ 0,1 н раствора йода, из бюретки приливают 30 см³ 0,1 н раствора гидроксида натрия, оставляют на 15–20 мин, подкисляют серной кислотой и титруют тиосульфатом натрия в присутствии крахмального раствора.

Содержание редуцирующих веществ в 100 г сухих веществ патоки условно считают на глюкозу.

Массовая доля редуцирующих веществ в патоке в пересчете на сухие вещества (%) рассчитывается по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 0,009 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \quad (2.1)$$

где V – количество 0,1 н раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование 25 см³ 0,1 н раствора йода в контрольном опыте, см³; V_1 – количество 0,1 н раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование остатка йода после взаимодействия с редуцирующими веществами патоки, см³; K – поправочный коэффициент 0,1 н раствора тиосульфата натрия; 0,009 – количество глюкозы, соответствующее 1 см³ 0,1 н раствора йода или 0,1 н раствора тиосульфата натрия, г; m – масса патоки, взятая для определения редуцирующих веществ, г; W – массовая доля влаги в патоке.

5 Определение кислотности патоки

Кислотность патоки обуславливается наличием в ней кислых фосфатов, перешедших из крахмала в патоку, возможным остатком минеральной кислоты, применявшейся при гидролизе крахмала (в нестандартной патоке), а также кислотами, которые образуются при хранении за счет развития кислотообразующих бактерий. Показатель кислотности выражается в количестве см³ 0,1 н раствора гидроксида натрия, необходимого для нейтрализации 100 г сухих веществ патоки при индикаторе фенолфталеине.

Кислотность патоки оказывает влияние на качество готовой карамели, которую получают увариванием раствора сахара и патоки. Известно, что при повышенной температуре и в кислой среде сахароза гидролизуетея с образованием глюкозы и фруктозы. Эта реакция при определенных условиях протекает при получении карамели, так как конечная температура уваривания карамельной массы 140–145 °С. Использование патоки с высокой кислотностью создает кислую реакцию среды, необходимую для инверсии сахарозу. Образование инвертного сахара нежелательно, так как увеличивается содержание редуцирующих сахаров в готовом продукте. Кроме того, фруктоза, как самый гигроскопичный сахар, повышает гигроскопичность карамели, которая при хранении начинает поглощать влагу из окружающего воздуха.

Ход работы. 100 см³ основного раствора патоки помещают в коническую колбу, прибавляют три-пять капель фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором щелочи до розового окрашивания. Результат пересчитывают на 100 г сухих веществ патоки.

Кислотность патоки (град) рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot C}, \quad (2.2)$$

где V – количество 0,1 н раствора гидроксида натрия, пошедшее на титрование, см³; m – масса патоки, содержащаяся в 100 см³ основного раствора, г; C – массовая доля сухих веществ в патоке, %.

6 Определение температуры карамельной пробы

Ход работы. При определении температуры карамельной пробы для карамельной патоки в медный тазик помещают 100–150 г патоки и нагревают на электрической плитке. Время варки должно составлять 20–25 мин. Вначале патока кипит спокойно, затем по мере удаления воды пузырьки становятся более крупными. Патоку начинают перемешивать термометром и наблюдают, не начала ли она менять окраску, не появляются ли темные пятна или прожилки. Если это произошло, то отмечают температуру и считают, что патока выдержала пробу только до этой температуры.

Если окраска патоки не изменяется, то продолжают нагревать до температуры, установленной для данного вида патоки. Затем содержимое тазика аккуратно выливают на керамическую плитку и после охлаждения определяют качество леденца. Леденец должен быть прозрачным, без темных прожилок и пятен.

При определении температуры карамельной пробы низкоосахаренной патоки в медный тазик вносят 100 г сахара-песка, приливают 25 см³ воды и нагревают на плитке до полного растворения сахара, после чего туда прибавляют 50 г патоки. Смесь перемешивают термометром до получения однородной массы, продолжая нагревать до 150 °С. Наблюдают за изменением окраски.

При достижении в массе температуры 155 °С содержимое выливают на керамическую плитку. Леденец должен быть прозрачным, без темных прожилок и пятен.

По результатам опытов 3–6 заполняют таблицу 2.3, характеризующую качество полученной в ходе лабораторной работы патоки. Делают вывод о соответствии показателей установленным ГОСТ 33917-2016 «Патока крахмальная. Общие технические условия» (см. таблица 2.4).

Таблица 2.3 – Показатели качества патоки, полученной при различных способах биоконверсии крахмала

Показатель	Значение, полученное для патоки, изготовленной с использованием катализатора:	
	<i>наименование и дозировка катализатора</i>	...
Продолжительность гидролиза		
Цвет йодной пробы		
Содержание сухих веществ после уваривания		
Содержание редуцирующих веществ		
Кислотность		
Температура карамельной пробы		

2.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Крахмал. Крахмал относится к важнейшим полисахаридам, является смесью двух полисахаридов, построенных из остатков α -D-глюкопиранозы – амилозы (~20%) и амилопектина (~80%).

Амилоза (поли-1,4- α -D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза) – неразветвлённый полисахарид, состоит из остатков α -D-глюкопиранозы, соединённых 1,4-гликозидными связями ($\alpha(1\rightarrow4)$ или α -связи). Степень полимеризации в зависимости от источника получения составляет 1–3 тыс. звеньев.

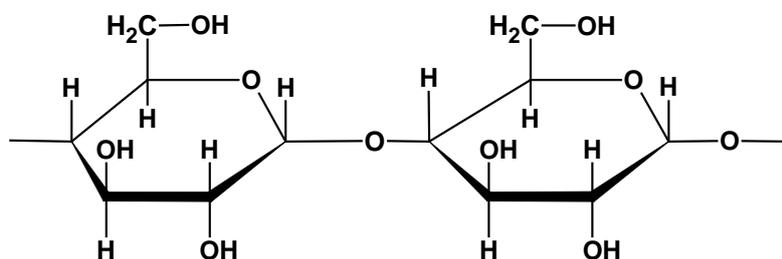


Рисунок 2.1 – Строение амилозы

Элементарное звено амилозы имеет конформацию «кресла», вследствие α -конфигурации гликозидной связи макромолекула амилозы закручивается в спираль. Каждый виток спирали содержит 5–6 моносахаридных звеньев.

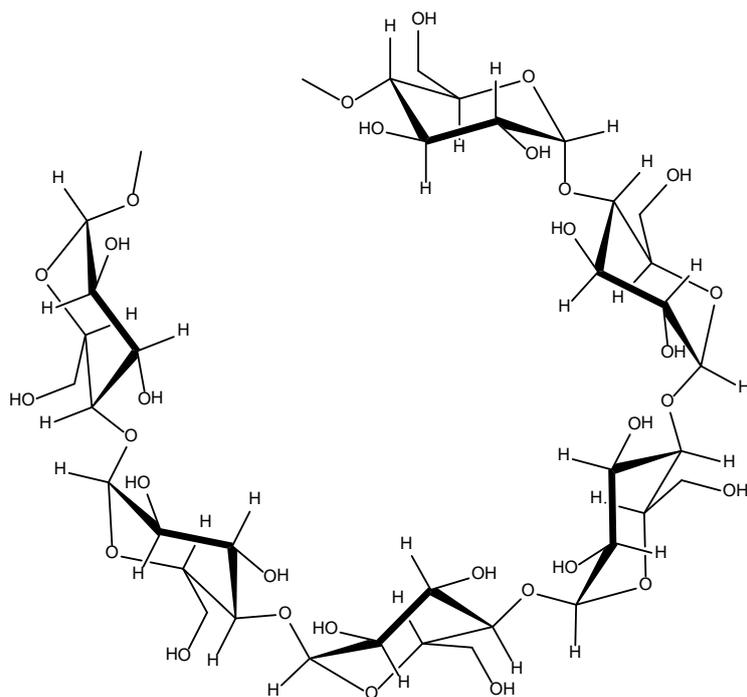


Рисунок 2.2 – Амилоза

Амилопектин – разветвлённый полисахарид, цепи которого образуются за счёт α -связей и состоят из 25-45 остатков α -D-глюкопиранозы.

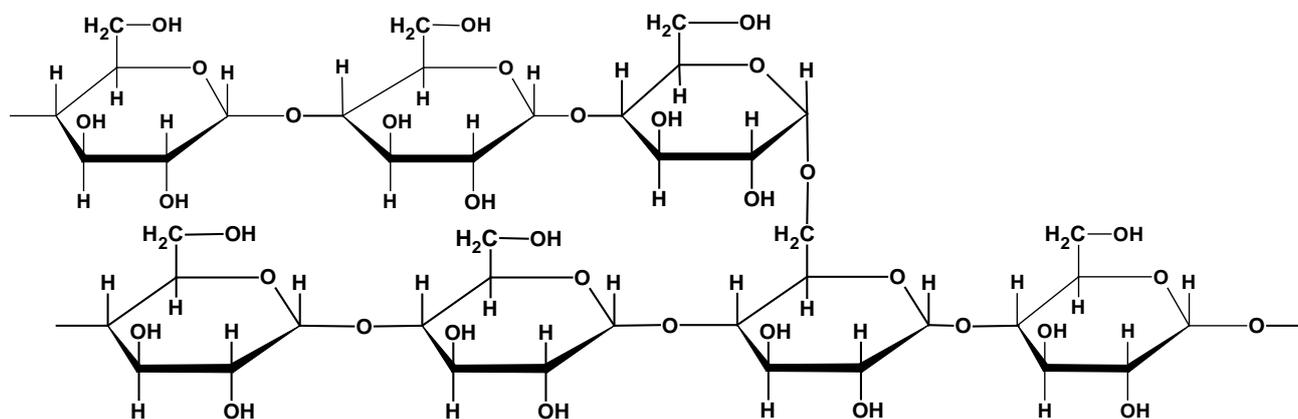


Рисунок 2.3 – Строение амилопектина

Самая длинная центральная цепь может включать до 60 звеньев моносахарида. Между собой цепи соединяются $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидными связями. Цепи амилопектина также закручиваются в спираль, и макромолекула принимает шаровидную форму.

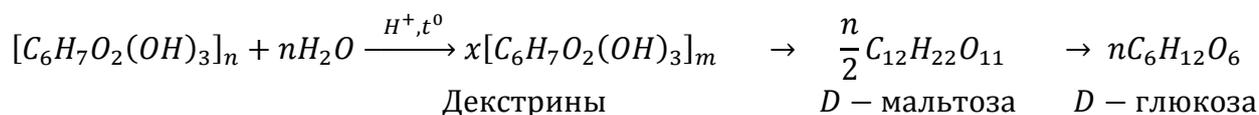
Помимо крахмала растительного происхождения в печени человека и животных обнаружен животный крахмал – гликоген. Он имеет структуру, очень похожую на амилопектин, с той лишь разницей, что макромолекула еще более разветвлена и содержит более короткие цепи по 12–18 звеньев α -глюкозы в каждой.

Крахмал встречается в виде зерен белого цвета, форма и размеры которых характерны для каждого рода растений. Зерна крахмала не растворимы в холодной воде; если разрушить наружную мембрану растиранием, то крахмал в холодной воде набухает и образует гель. В горячей воде мембрана зерен лопаются и крахмал также образует коллоидный раствор (гель). При нагревании крахмала происходит разрушение макромолекул с образованием соединений с меньшей молекулярной массой – декстринов. За счет частичной дегидратации декстрины приобретают желтую и золотисто-коричневую окраску. Этот процесс происходит при выпечке мучных кондитерских изделий, поскольку крахмал составляет основную часть пшеничной муки. В отличие от моно- и олигосахаридов полисахариды не обладают сладким вкусом.

Целесообразно начать изучение химических свойств крахмала с качественной реакции. Линейная полимерная молекула амилозы свернута в спираль, внутри которой находится канал размером около 0,5 нм. Внутри этого канала могут вовлекаться некоторые молекулы, например йода. Йод образует с крахмалом комплексное соединение интенсивно синего цвета. Эта реакция чрезвычайно специфична и является качественной для обнаружения как крахмала, так и йода.

Одним из самых важных свойств любых полисахаридов, в том числе и крахмала, является реакция гидролиза.

Амилоза и амилопектин гидролизуются при нагревании в кислой среде с разрывом связей между звеньями α -D-глюкопиранозы:



Гидролиз проходит постепенно. Первыми образуются декстрины (осколки макромолекул крахмала), затем D-мальтоза и небольшое количество D-изомальтозы. Конечным продуктом является D-глюкоза (рисунок 2.4).

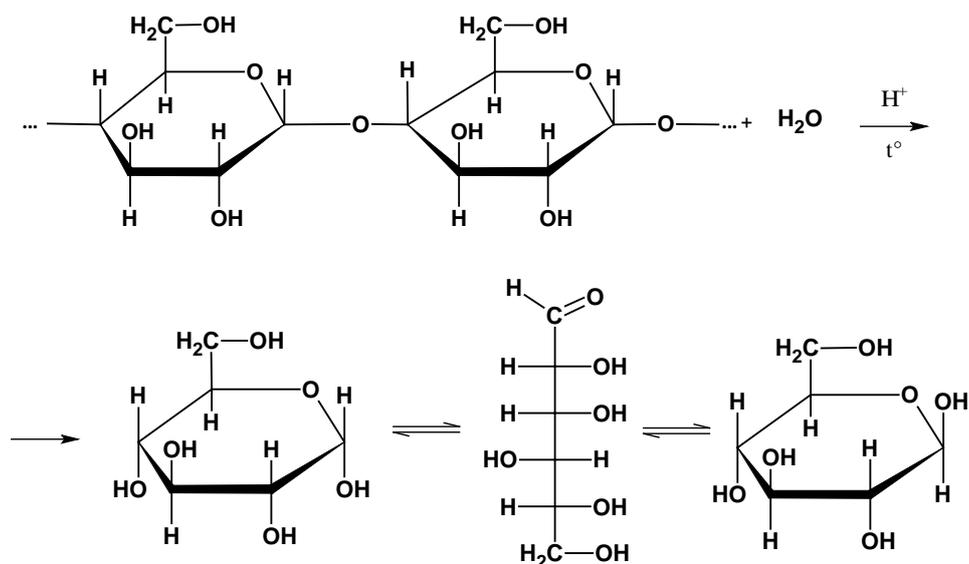


Рисунок 2.4 – Гидролиз амилозы

α -Связь менее устойчива, чем β -связь, поэтому крахмал гидролизуется в более мягких условиях, чем целлюлоза. Крахмал также подвергается гидролизу под действием группы ферментов, называемых амилаза.

Крахмальная патока. Крахмальная патока – это продукт неполного гидролиза крахмала разбавленными кислотами или амилазными ферментами, полученный путем очистки и уваривания крахмального гидролизата до концентрации сухих веществ около 80 %. Патока представляет собой бесцветную или слегка желтоватую, очень вязкую жидкость со сладким вкусом. Сладость ее в 3–4 раза ниже сладости сахарозы. Патока используется в качестве антикристаллизатора при получении карамели, при варке варенья, фруктовых сиропов, повидла, для загущения ликеров, для подслащивания безалкогольных напитков и улучшения качества хлебобулочных изделий.

По химическому составу крахмальная патока представляет собой смесь декстринов, мальтозы, глюкозы и воды. Соотношение компонентов зависит от степени гидролиза крахмала: чем она выше, тем больше содержание глюкозы и меньше – декстринов. В стандартной крахмальной патоке содержится в пересчете на сухие вещества в среднем 19–22 % мальтозы и 55–60 % декстринов, количество воды составляет 18–22%.

Основной технологической операцией при производстве патоки является гидролиз крахмала, который проводят в присутствии катализатора – либо минеральных кислот, либо ферментных препаратов, либо и того, и другого. При любом способе проведения гидролиза процесс (условно) состоит из трех стадий: клейстеризации крахмала, разжижения и осахаривания. В начальной стадии гидролиза в присутствии катализатора происходит температурная клейсте-

ризация крахмала – нарушается структура крахмальных зерен, образуется гомогенная масса, обладающая высокой вязкостью. Практически одновременно начинается процесс разжижения крахмала за счет разрыва гликозидных связей в длинных цепочках молекул крахмала под воздействие катализатора. По месту разрыва присоединяется молекула воды. Образуются промежуточные продукты гидролиза различной молекулярной массы. В разжиженном продукте низкой вязкости легче протекают процессы разрыва молекул крахмала вплоть до конечного продукта – глюкозы.

В процессе производства патоки важно определить окончание процесса осахаривания крахмала. Контроль за ходом данного процесса ведут по йодной пробе. Известно, что в результате образования ряда химических комплексных соединений, йод дает с крахмальным клейстером характерное синее окрашивание. По мере образования декстринов в процессе гидролиза крахмала йодная проба меняет цвет от сине-фиолетового до вишнево-красного и других оттенков красного цвета, характерных для амило- и эритродекстринов. Ахро- и мальтодекстрины цвет йодной пробы не меняют.

Так как наличие минеральной кислоты не допускается в пищевом продукте, после достижения требуемой степени осахаривания ее нейтрализуют. В промышленности при кислотном гидролизе крахмала используют только хлороводородную кислоту, нейтрализацию которой проводят кальцинированной содой до рН 4,0–5,0, соответствующего минимуму термического разложения глюкозы.

В зависимости от способа производства и углеводного состава патоку подразделяют на следующие виды:

- низкоосахаренную;
- карамельную кислотную;
- карамельную ферментативную;
- мальтозную;
- высокоосахаренную.

Качество патоки по органолептическим и физико-химическим показателям нормируется ГОСТ 33917-2016 «Патока крахмальная. Общие технические условия». Патока представляет собой густую вязкую жидкость от бесцветного до бледно-желтого цвета. Карамельная ферментативная, мальтозная и высокоосахаренная патока прозрачные, для низкоосахаренной и карамельной кислотной патоки допускается опалесценция.

В таблице 2.4 приведены физико-химические показатели различных видов патоки в соответствии с ГОСТ 33917-2016.

Таблица 2.4 – Физико-химические показатели качества крахмальной патоки

Наименование показателя	Норма для патоки				
	низкосахаренной	карамельной		мальтозной	высокосахаренной
		кислотной	ферментативной		
Массовая доля сухого вещества, %, не менее	78,0				
Массовая доля редуцирующих веществ в пересчете на сухое вещество (глюкозный эквивалент), %	26–35	36–44	36–44	38–70	45 и более
Массовая доля отдельных углеводов: -глюкоза, % -мальтоза, %	Не более 15 5–20	Не нормируется	5–20 10–15	Не более 25 35 и более	Не менее 20 Не нормируется
Массовая доля общей золы в пересчете на сухое вещество, %	0,4				
Водородный показатель, рН	3,5–6,0				
Кислотность, см ³ гидроксида натрия, не более, для патоки: -из картофельного крахмала; -из кукурузного и других видов зернового крахмала	27 15		Не нормируется		
Температура карамельной пробы, °С	155	145	140	Не нормируется	
Цвет йодной пробы	Не нормируется		Желтый различных оттенков		

Применение определенного вида патоки для тех или иных целей обусловлено ее химическим составом и свойствами основных ее компонентов. Декстрины, обладая высокой вязкостью, выполняют роль антикристаллизатора сахарозы (чем выше вязкость растворов, тем ниже скорость кристаллизации). Это свойство декстринов используется при производстве карамели, которая представляет сахаро-паточный раствор, уваренный до влажности не более 3 %. Сахароза при такой низкой влажности кристаллизуется. Чтобы избежать образования кристаллов и получить аморфную массу, каковой является карамель, добавляют антикристаллизатор, т. е. патоку с высоким содержанием декстринов. Редуцирующие сахара патоки также тормозят кристаллизацию сахарозы в карамельной массе за счет повышения содержания сухих веществ и снижения растворимости сахарозы, но свойство антикристаллизатора у них выражено значительно слабее, чем у декстринов. Кроме того, глюкоза и мальтоза (особенно после прогревания) становятся гигроскопичными. Следовательно, повышение содержания редуцирующих сахаров в патоке приводит к уменьшению ее антикристаллизационных свойств за счет снижения количества декстринов и обуславливает получение карамели с высокой гигроскопичности. При хранении карамель поглощает влагу из окружающего воздуха, становится липкой, мутной и теряет свои качества. В настоящее время в РФ вырабатывают карамельную и низкосахаренную патоку, в состав которой входит около 56–74 % декстринов. Данная патока является лучшим антикристаллизатором и позволяет получать малогигроскопичную карамель.

В качестве сахаристого продукта, содержащего в основном мальтозу и глюкозу, используют глюкозную высокосахаренную патоку. Эта патока обладает более сладким вкусом, меньшей вязкостью и большей гигроскопичностью, чем карамельная и низкосахаренная патока. Вязкость высокосахаренной патоки втрое ниже вязкости карамельной патоки, так как содержание декстринов в ней составляет всего 5–8 %. Благодаря этим качествам высокосахаренная патока находит широкое применение в производстве варенья, джемов, фруктовых сиропов, повидла, желе, при консервировании плодов и ягод, предотвращая их засахаривание при хранении. Использование этой патоки в хлебопечении и при выработке мучных кондитерских изделий способствует удлинению срока их хранения за счет повышения влагоудерживающей способности и замедления процесса черствения. Применение высокосахаренной патоки в производстве помадных конфет улучшает их вкусовые достоинства и повышает стойкость против высыхания. Кроме того, эта патока увеличивает пластичность теста, повышает намакаемость и окрашивает поверхность изделий в золотисто-желтый цвет.

Контрольные вопросы

- 1) Расскажите о строении, физических и химических свойствах крахмала.
- 2) Какие продукты (промежуточные и конечные) образуются при гидролизе крахмала?
- 3) С помощью каких катализаторов можно осуществить гидролиз крахмала?
- 4) Какие ферментные препараты используются для осахаривания крахмала и получения патоки?
- 5) Каким образом цвет реактива Люголя характеризует степень гидролиза крахмала?
- 6) Что представляет собой крахмальная патока?
- 7) Какие виды крахмальной патоки вы знаете?
- 8) Для каких целей применяется патока в пищевой промышленности?
- 9) Какие показатели качества крахмальной патоки устанавливает ГОСТ 33917-2016?
- 10) Расскажите порядок действий при определении содержания редуцирующих веществ в патоке.
- 11) В чем сущность определения температуры карамельной пробы патоки?

Лабораторная работа № 3

**БИОКОНВЕРСИЯ КРАХМАЛОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ.
ПОЛУЧЕНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА (4 Ч)**

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по проведению биоконверсии крахмалосодержащего сырья для получения этилового спирта.

Задания:

- 1) освоить теоретический материал, представленный в разделе 3.2;
- 2) получить сусло из крахмалосодержащего сырья, проведя его биоконверсию амилолитическими ферментными препаратами;
- 3) получить бражку в результате спиртового брожения сусла;
- 4) получить этиловый спирт-сырец перегонкой бражки и исследовать его качество.

**3.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ
ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

Приборы и оборудование: технические весы; аналитические весы; мельница для зерна; плитка электрическая; аппарат для перегонки браги; сахариметр; кастрюля с крышкой; бутылка для сбраживания с пробкой и трубкой для гидрозатвора; термометр; спиртометр; градуированная колба-приемник вместимостью 100 см³ или мерный цилиндр; мерные цилиндры на 10 и 100 см³; колба-приемник вместимостью 500 см³; колба вместимостью 500 см³ со шлифом; обратный холодильник; баня водяная.

Материалы и реактивы: пшеница или другое зерновое сырье или картофель; амилолитические ферментные препараты или солодовое молоко; вода дистиллированная; раствор Люголя; дрожжи; сахар-песок; раствор бромтимолового синего; растворы гидроксида натрия концентраций 0,05 и 0,1 моль/дм³; раствор серной кислоты концентрацией 0,1 моль/дм³.

1 Приготовление сусла

Ход работы. Вначале подготавливают сырье, выбранное для производства сусла. Зерновое и бобовое сырье очищают от пыли, земли, камней и других примесей. Картофель промывают. После этого зерновое и бобовое сырье измельчают таким образом, чтобы просеивание через сито размером отверстий 1 мм составляло 85–95 %. Картофель измельчают на терке до размера частиц не более 3 мм.

Требуемое количество сырья отвешивают на технических весах и помещают в кастрюлю. К сырью добавляют воду из такого расчета, чтобы после осахаривания в сусле содержалось 16–18 % углеводов (по сахариметру). Теоретически 1 кг крахмала под действием амилолитических ферментов превращается в 1,11 кг сахара. Таким образом, для достижения содержания 18 % сахара в сусле необходимо добавить 5,06 л воды на каждый кг крахмала. В случае использования влажного сырья (картофеля или подмоченного зерна), его влага входит в указанное количество добавляемой воды. В таблице 3.1 приведено среднее содержание крахмала в различных видах растительного сырья.

Таблица 3.1 – Среднее содержание крахмала в различных видах растительного сырья, %

Сырье	Крахмал	Сырье	Крахмал
Горох	20–48	Пшеница	48–66
Картофель	10–25	Рис	73–76
Кукуруза	58–69	Рожь	46–55
Овес	34–45	Чечевица	47–57
Просо	42–65	Ячмень	43–55

Кастрюлю с сырьем и водой ставят на плитку, накрывают крышкой и доводят до кипения. Время разваривания составляет от 1,5 до 2 ч и зависит от качества сырья, от степени его измельчения.

После разваривания массу охлаждают до температуры осахаривания (55–58 °С) и вносят амилолитические ферментные препараты амилосубтилин, глюкаваморин. Дозировку рассчитывают исходя из активности ферментных препаратов (*по приложению В*). Смесь тщательно перемешивают и выдерживают при заданной температуре до полного осахаривания. Время осахаривания различается для разных видов сырья. Так, для картофеля составляет 30 мин, для зерновых – 1,5 ч, для ячменя – до 2 ч. В этот период необходимо периодически тщательно перемешивать смесь.

Полноту осахаривания устанавливают по йодной пробе (лабораторная работа № 2), а также, определяя содержание сухих веществ по сахариметру. Осахаренную массу охлаждают до температуры сбраживания 28–30 °С. Стоит помнить, что полученное сусло содержит большое количество легкодоступных углеводов, а потому, является питательной средой для размножения микроорганизмов. Поэтому необходимо как можно скорее охладить сусло и внести в него дрожжевой затвор.

В тетрадь записывают количество сырья и воды, взятое для приготовления сусла, количество добавленных ферментных препаратов, содержание сахара по сахариметру в готовом сусле и цвет йодной пробы.

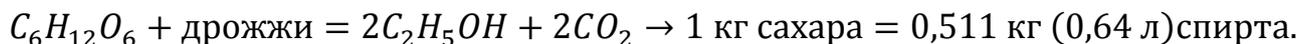
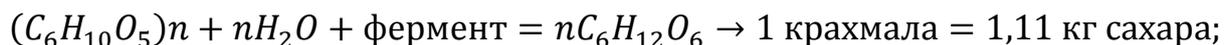
2 Приготовление дрожжевого затора

Ход работы. Дрожжи разводят в теплой воде, из расчета на 1 кг дрожжей – 10–14 л подогретой до 30 °С воды. Также в затор вносится небольшое количество сахара (5–10 г на 50–100 г дрожжей). Затор хорошо перемешивается, вливается в охлажденное до 28–30 °С сусло, после чего смесь переливают в бутылку для сбраживания.

3 Сбраживание сусла

Ход работы. Бутылку для сбраживания герметично закрывают пробкой с отводной трубкой и устанавливают гидрозатвор. Гидрозатвор нужен для выпуска углекислого газа, который образуется при брожении, в условиях герметичности самого процесса. Брожение имеет три стадии: начальное брожение – взбраживание, главное брожение и дображивание. На начальном этапе происходит насыщение бражки углекислым газом, температура повышается на 2–3 °С, вкус остается сладким. При главном брожении начинается интенсивное выделение углекислого газа, на поверхности образуется пена, температура повышается до 30 °С. В период брожения важным является, чтобы сусло не перегревалось. Оптимальная температура брожения составляет 28–30 °С. При дображивании уровень бражки понижается, пена оседает, температура уменьшается до 25–26 °С, вкус становится горько-кислым. Конец брожения определяют по прекращению выделения пузырьков углекислого газа. Длительность брожения зависит от многих факторов и может составлять от 3 до 20 сут. Зрелая бражка является многокомпонентной смесью, содержащей воду, этиловый спирт, остаточные сахара и сопутствующие примеси.

Выход спирта в результате сбраживания сусла можно рассчитать из следующих уравнений:



Таким образом, зная содержание сахара или крахмала в любом сырье, можно рассчитать теоретический выход спирта из него.

По сахариметру определяют содержания сахара в конце брожения и, зная начальное содержание сахара в сусле, рассчитывают количество сброженного сахара и теоретический выход этанола.

В тетрадь записывают содержание сахара по сахариметру и расчетный выход этанола.

4 Перегонка браги и получение этилового спирта

Ход работы. По окончании сбраживания бражку снимают с осадка и переливают в куб аппарата для перегонки, при этом куб заполняют не более чем на 75 % от общего объема.

С помощью имеющихся гибких шлангов обеспечивают подвод и отвод охлаждающей воды для аппарата.

Перегонку осуществляют в три этапа. На первом этапе отгоняется так называемая головная фракция. Эта фракция имеет неприятный резкий запах, ее количество составляет около 10 % от ожидаемого количества конечного продукта. Головная фракция начинает отбираться при температуре 65–68 °С. Как только появляются первые капли, нагрев уменьшают и отбирают 10 % от расчетного количества этанола. Для удобства в качестве приемника используют градуированную колбу или мерный цилиндр.

Затем нагрев вновь увеличивают и отбирают основную фракцию в новый приемник. Чистый этиловый спирт кипит при температуре 78 °С. Отбор основной фракции ведется до температуры 85 °С, по ее достижении дистиллят практически перестает собираться в приемник. На этом процесс перегонки можно остановить, либо увеличить интенсивность нагрева до максимума и отобрать хвостовую фракцию, которая содержит некоторое количество этанола и может быть очищена ректификацией. С помощью мерного цилиндра фиксируют объем выделившегося при перегонке спирта-сырца.

5 Определение объемной доли этилового спирта

Ход работы. Крепость спирта выражается в процентах по объему, которые представляют собой число объемных частей безводного спирта в 100 объемных частях водно-спиртового раствора при температуре 20 °С. Содержание спирта в спирте-ректификате определяют с помощью ареометра для спирта – спиртометра при температуре 20 °С.

6 Определение содержания кислот

Кислотность спирта обусловлена в основном наличием свободной уксусной кислоты. Поэтому кислотность спиртовых растворов условно выражают в пересчете на уксусную кислоту. Определение количества кислот в спирте основано на титровании их гидроксидом натрия или калия с образованием соответствующих солей.

Ход работы. В коническую или круглодонную колбу вместимостью 500 см³ с пришлифованным обратным холодильником помещают 100 см³ испытуемого спирта, 100 см³ дистиллированной воды и кипят на водяной бане в течение 15 мин. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, закрывая верхнюю часть холодильника натронной известью. К содержимому колбы прибавляют 10 капель раствора бромтимолового синего и титруют раствором гидроксида натрия концентрацией 0,05 моль/дм³ до появления не исчезающей при взбалтывании в течение 1–2 мин голубой окраски.

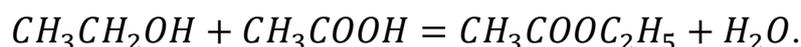
Массовую концентрацию кислот в пересчете на уксусную кислоту (мг/дм³ безводного спирта) определяют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 3 \cdot 10 \cdot 100}{C}, \quad (3.1)$$

где V – количество раствора гидроксида натрия концентрацией 0,05 моль/дм³, пошедшее на титрование 100 см³ испытуемого спирта, см³; 3 – масса уксусной кислоты, соответствующая 1 см³ раствора гидроксида натрия концентрацией 0,05 моль/дм³, мг; 10 – коэффициент пересчета на 1 дм³ спирта; C – объемная доля этилового спирта, %.

7 Определение содержания сложных эфиров

В спирте содержится в основном уксусно-этиловый эфир, который образуется при взаимодействии уксусной кислоты с этиловым спиртом по уравнению:



Поэтому результат анализа дается в пересчете на этот эфир.

Определение эфиров основано на их омылении щелочью с образованием соответствующей соли уксусной кислоты и этилового спирта.

Ход работы. После определения содержания кислот к нейтрализованному спирту прибавляют 10 см³ раствора гидроксида натрия концентрацией 0,1 моль/дм³. Смесь кипятят в колбе с обратным холодильником в течение 1 ч.

Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры. К содержимому приливают 10 см³ раствора серной кислоты концентрацией 0,1 моль/дм³ и избыток кислоты оттитровывают раствором гидроксида натрия концентрацией 0,1 моль/дм³.

Содержание эфиров (мг/дм³ безводного спирта) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 8,8 \cdot 10 \cdot 100}{C}, \quad (3.2)$$

где V – количество раствора гидроксида натрия концентрацией 0,1 моль/дм³, пошедшее на титрование 100 см³ испытуемого спирта, см³; 8,8 – масса уксусноэтилового эфира, соответствующая 1 см³ раствора гидроксида натрия концентрацией 0,1 моль/дм³, мг; 10 – коэффициент пересчета на 1 дм³ спирта; C – объемная доля этилового спирта, %.

По результатам лабораторной работы составляют таблицу 3.2, характеризующую выход и качество полученного спирта-сырца. Делают вывод о соответствии показателей установленным ГОСТ 131-2013 «Спирт этиловый-сырец из пищевого сырья. Технические условия» (таблицы 3.3, 3.4).

Таблица 3.2 – Характеристика процесса получения этилового спирта-сырца из крахмалсодержащего сырья и его качество

Показатель	Значение
Содержание сахара в сусле	
Содержание сахара в бражке	
Расчетный выход этилового спирта	
Практический выход этилового спирта-сырца	
Объемная доля этилового спирта в спирте-сырце	
Внешний вид, прозрачность спирта-сырца	
Запах спирта-сырца	
Содержание кислот в спирте-сырце	
Содержание сложных эфиров в спирте-сырце	

3.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Этиловый спирт – бесцветная жидкость с характерным запахом, жгучим вкусом, легко воспламеняющаяся. Этиловый спирт гигроскопичен, смешивается с водой, эфиром, глицерином, бензином и другими органическими растворителями в любых соотношениях.

Пищевой этиловый спирт является сырьем для многих производств пищевой промышленности, химии, медицины и других отраслей. Из этилового спирта в пищевой промышленности производят ликероводочные изделия, крепленые вина, слабоалкогольные коктейли.

В зависимости от стадии производства различают спирт-сырец, спирт-ректификат и питьевой этиловый спирт.

Спирт-сырец крепостью около 88 % получают методом дистилляции (перегонки) сброженного сырья. В нем содержится большое количество сивушных масел и других примесей. Для очистки спирт-сырец подвергают ректификации. Температуры кипения содержащихся в дистилляте примесей отличаются от температуры кипения чистого этанола. Примеси, которые закипают при низких температурах, называются головными, при высоких – хвостовыми. Для их отделения используют ректификационные колонны. Это позволяет повысить содержание чистого этанола до 97 %. Для производства питьевого этанола ректификат разводят дистиллированной водой таким образом, чтобы крепость полученной жидкости составляла 95 %. Получившийся питьевой спирт используется для производства алкогольной продукции.

Этиловый спирт-сырец вырабатывают из:

- зерна, картофеля или их смеси;
- смеси зерна, картофеля, сахарной свеклы и мелассы, сахара-сырца и другого сахаро- и крахмалосодержащего сырья;
- мелассы.

Подготовка сырья. Подготовка сырья к развариванию включает следующие операции:

- очистку от примесей;
- измельчение;
- приготовление замеса (кашки).

Перед подачей в производство зерно предварительно очищают от пыли, земли, камней на воздушно-ситовых сепараторах, от металлических примесей – на магнитных сепараторах. Овес перед измельчением обрушивают (отделяют пленки) на овсорушках с рифленой поверхностью. Картофель от примесей земли, соломы, ботвы, камней, песка и других фракций освобождают с помощью

соломолушек и камнелушек. Для окончательного отделения от земли картофель моют в картофелемойках 5–7 мин. Зерно не моют.

Очищенное сырье направляют на измельчение. Цель измельчения – подготовить крахмал сырья к действию ферментов. Зерно и картофель в производстве спирта необходимо измельчать как можно тоньше, чтобы увеличить гидролиз составных веществ сырья. Картофель измельчают на молотковых дробилках или картофелетерках до размера частиц не более 3 мм, зерно – на молотковых дробилках или вальцевых станках до размера частиц 1,0–1,5 мм. Более тонкое измельчение (до 0,25 мм) позволяет вести разваривание при более низкой температуре (80–105 °С). Измельченное зерно смешивают с водой в соотношении 1:2–1:3 (получают замес), к картофелю добавляют 15–20 % воды от массы сырья (получают картофельную кашку). Количество добавляемой воды должно быть таким, чтобы в полученном сусле концентрация сухих веществ составляла 18–19 %.

Разваривание. Цель разваривания – подготовка крахмала сырья к осахариванию амилолитическими ферментами солода или микробных ферментных препаратов.

Клейстеризация протекает в следующем интервале температур: для картофельного крахмала – 59–64 °С; пшеничного – 54–62 °С; ржаного – 50–55 °С; кукурузного – 65–70 °С; ячменного – 60–80 °С. При 90 °С вязкость достигает максимума, при увеличении температуры выше 110 °С вязкость крахмального клейстера резко снижается, происходит разжижение или растворение крахмала: картофельного – при 143 °С; ржаного – при 130 °С; пшеничного – при 150 °С; кукурузного – при 154 °С. Именно при этих температурах и проводят разваривание.

Перед развариванием с целью экономии пара на разваривание, а также для набухания и клейстеризации крахмала проводят подваривание. Для этого замес быстро подогревают экстрапаром (вторичным паром) до температуры 85–95 °С, выдерживают 1,0–1,5 ч; картофельную кашку нагревают до 40–45 °С, длительность выдержки не более 30 мин. После подваривания крахмалистое сырье поступает на разваривание, где подвергается обработке при высоких температурах.

Готовность разваренной массы определяют по цвету. Он должен быть в зависимости от степени измельчения сырья, температуры и продолжительности разваривания, темно-желтым со светло-коричневым оттенком для зерновой массы, для картофельной массы – светло-коричневым с зеленоватым оттенком.

Осахаривание. Цель осахаривания – гидролиз крахмала и других составных частей сырья с помощью ферментов осахаривающих материалов и получение осахаренного сусла. Осахаривающими материалами являются свежepro-

росший солод или микробные ферментные препараты. В основном применяют препараты, содержащие преимущественно α -амилазу: Амилосубтилин ГЗх, Глюкоаваморин Гх, Амилоризин Пх, Амилодиастатин Гх и др. Можно использовать смесь сухой культуры ферментных препаратов и солода. Их вместе измельчают и готовят суспензию наподобие солодового молока.

Осахаривание разваренной массы осуществляют непрерывным, реже периодическим способами.

Независимо от способа, осахаривание предусматривает следующие операции:

- охлаждение разваренной массы до температуры осахаривания;
- смешивание с осахаривающими материалами;
- осахаривание крахмала;
- охлаждение сусла до температуры «складки», т. е. начальной температуры брожения;
- перекачивание сусла в дрожжевое и бродильное отделение завода.

Полнота осахаривания определяется по йодной пробе. При использовании в качестве осахаривающего материала солодового молока цвет раствора йода с каплей фильтрата не должен изменяться. Красный цвет свидетельствует о наличии в сусле декстринов, сине-фиолетовый – о присутствии неосахаренного крахмала. Применение ферментных препаратов для осахаривания может оставлять окраску фильтрата с йодом светло-коричневой.

Осахаренное сусло должно иметь следующие показатели: содержание сухих веществ – 16–18 %, в том числе 13–15 % – сбраживаемые сахара; кислотность должна быть в пределах 0,2–0,3 град, что соответствует рН 4,9–5,6.

Подготовка дрожжей к сбраживанию. Для сбраживания сусла применяют дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae*, так называемые спиртовые дрожжи, которые вначале производственного сезона размножают из чистой культуры, хранящейся в пробирках. Многоступенчато увеличивая объем питательной среды от пробирки до маточника (500 дм³), получают засевные дрожжи. Из маточника их передают в дрожжанки, где готовят производственные дрожжи периодическим или полунепрерывным способом на пастеризованном сусле. При устоявшемся режиме работы завода чистую культуру дрожжей не размножают, а в качестве засевных дрожжей используют часть производственных, предварительно подкисленных для подавления посторонних микроорганизмов.

Сбраживание зерно-картофельного сусла. Цель данной стадии – сбраживание сахаров сусла дрожжами и образование спирта.

В процессе брожения можно выделить три периода: возбуждение, главное брожение и дображивание. Брожение проводят в закрытых бродильных аппаратах – вертикальных цилиндрических емкостях со сферическим или кониче-

ским днищем и крышкой. Внутри имеется змеевик для охлаждения бродящей среды.

Брожение проводят периодическим, циклическим и непрерывно-поточным способами. Процесс брожения проводится в закрытых бродильных чанах, дрожжи вводятся в количестве 6–8 % от объема сусла, брожение длится

2–3 сут, образующийся углекислый газ уносит с собой некоторое количество спирта и примесей, которые улавливаются. В разные периоды температура брожения поддерживается на уровне 25–30 °С, для чего в бродильных аппаратах установлен змеевик для охлаждения. Брожение проводят периодическим, циклическим или непрерывно-поточным способами. По окончании процесса зрелую бражку с объемной долей спирта 8–8,5 % направляют на брагоректификацию. Зрелая бражка должна иметь крепость – содержание спирта, не менее 8,0–9,5 % об.

Получение спирта при сбраживании мелассы. Отличительной особенностью получения спирта из мелассы в сравнении со схемой производства спирта из зерно-картофельного сырья является отсутствие стадий разваривания и осахаривания. Это связано с тем, что меласса уже содержит сахара (в основном сахарозу), которые могут сбраживаться без дополнительной подготовки.

Перед сбраживанием мелассу обеззараживают хлорной известью, формалином или сульфанолам, подкисляют серной или соляной кислотой. При этом рН доводят до 5,1–5,3, если используется однопоточная схема сбраживания, и до 4,8–5,1 при двухпоточной схеме сбраживания. Если меласса сильно инфицирована и не исправляется кислотами и антисептиками, то ее подвергают тепловой обработке. При средней степени инфицирования используют пастеризацию (нагревают мелассу до температуры 85–95 °С, выдерживают 50–60 мин, затем охлаждают до температуры 25–30 °С). В случае высокой степени инфицирования проводят стерилизацию путем нагревания мелассы до 110 °С и выдержки в течение 2 мин с последующим охлаждением. Во всех случаях мелассу предварительно разбавляют до содержания сухих веществ 45–50 %.

Для обеспечения нормальной жизнедеятельности дрожжей и создания оптимальных условий брожения мелассу разбавляют водой до содержания сухих веществ в сусле 20–22 % при однопоточной схеме сбраживания, при двухпоточной схеме – сусло для выращивания дрожжей готовят концентрацией 12 % сухих веществ, а сусло для основного брожения концентрацией 32–34 % сухих веществ. Соотношение потоков сусла для дрожжей и основного при такой схеме 1:1, поэтому средняя концентрация сусла равна 22 % сухих веществ.

Получение спирта. Получаемая в результате брожения зрелая бражка имеет сложный химический состав: вода – 82–90 %; сухие вещества – 3–10 %; этиловый спирт с сопутствующими примесями – 5–8 %. Состав бражки суще-

ственно зависит от вида исходного сырья и технологических процессов, предшествующих выделению из нее спирта.

Сухие вещества бражки представлены как взвешенными частицами (дрожжевые клетки, нерастворимые частицы исходного сырья – шелуха, дробина), так и растворенными в спиртовой смеси различными органическими и неорганическими экстрактивными веществами (несброженные сахара, декстрины, белки и минеральные вещества). Общее содержание сухих веществ в зерновой бражке составляет 5–7 %, в картофельной – 3–4 %, в меласной – 8–10 %.

Летучие примеси, сопутствующие этиловому спирту, отличаются большим разнообразием (более 70). Общее их содержание обычно не превышает 0,5 % от содержания этилового спирта. По своей природе все примеси можно разделить на четыре группы: спирты, альдегиды, кислоты и эфиры. Кроме того, выделяют группу азотистых веществ, серосодержащих веществ т. д.

При кипячении зрелой бражки и конденсации выделяющихся паров (перегонка) получают продукт, называемый спиртом-сырцом. Спирт-сырец содержит около 0,5 % различных летучих примесей.

Все известные примеси можно разделить на головные, хвостовые, промежуточные и концевые. К головным относятся те, которые обладают большей летучестью, т. е. большим коэффициентом испарения, чем этиловый спирт, при всех концентрациях его в растворе. Основные представители головных примесей – уксусный, масляный альдегиды, акролеин, муравьиноэтиловый, уксусно-метиловый, уксусно-этиловый и диэтиловый эфиры.

Летучесть хвостовых примесей всегда меньше летучести спирта. Типичными хвостовыми примесями являются уксусная кислота и фурфурол.

Промежуточные примеси обладают двойными свойствами. Основные их представители – изоамиловый, изобутиловый, пропиловый спирты, изомасляноэтиловый, изовалерианоизоамиловый, уксусноизоамиловый эфиры.

Характерная концевая примесь – метанол.

Для получения спирта-сырца из бражки используют перегонную установку, состоящую из ректификационной колонки, дефлегматора и холодильника. Для очистки спирта-сырца от примесей используют ректификационные установки. Ректификацией называется процесс разделения жидкой смеси, состоящей из двух или большего числа компонентов, кипящих при разных температурах.

Этиловый спирт, полученный в результате перегонки бражки вместе с сопутствующими примесями, называется спиртом-сырцом. Качество спирта-сырца должно соответствовать требованиям ГОСТ 131-2013 «Спирт этиловый-сырец из пищевого сырья. Технические условия» (таблицы 3.3 и 3.4).

Таблица 3.3 – Органолептические показатели этилового спирта-сырца

Показатель	Характеристика
Внешний вид	Прозрачная жидкость без посторонних частиц
Цвет	Бесцветная жидкость
Вкус и запах	Характерные для этилового спирта-сырца, выработанного из соответствующего сырья, без привкуса и запаха посторонних веществ

Таблица 3.4 – Физико-химические показатели этилового спирта-сырца

Показатель	Значение для этилового спирта-сырца	
	из всех видов сырья (за исключением мелассы) или их смесей	из мелассы
Объемная доля этилового спирта-сырца, % не менее	88	
Массовая концентрация альдегидов (уксусный, кротоновый) в пересчете на безводный спирт, мг/дм ³ , не более	300	500
Массовая концентрация сложных эфиров в пересчете на безводный спирт, мг/дм ³ , не более	500	700
Объемная доля метилового спирта в пересчете на безводный спирт, %, не более	0,13	-
Массовая концентрация компонентов сивушного масла в пересчете на безводный спирт, мг/дм ³ , не более	5000	

Контрольные вопросы

- 1) Что такое этиловый спирт-сырец и этиловый спирт-ректификат? В чем отличия технологии получения этих продуктов?
- 2) Что такое ректификация?
- 3) Какое сырье используется для получения этилового спирта на пищевые цели?
- 4) В чем заключается суть операций разваривания и осахаривания крахмалсодержащего сырья? Какие вспомогательные материалы применяются на данных стадиях технологического процесса получения спирта?

- 5) При каких режимах осуществляется спиртовое брожение сусла?
- 6) Каким образом устанавливается окончание спиртового брожения сусла?
- 7) Что представляет собой и какие вещества содержит зрелая бражка?
- 8) Каким образом возможно рассчитать количество сырья, необходимое для получения заданного количества этилового спирта?
- 9) Что представляют собой головные и хвостовые фракции браги? Каким способом возможно их отделение при получении спирта-сырца?
- 10) Расскажите порядок действий при определении содержания кислот и сложных эфиров в этиловом спирте-сырце.
- 11) Какие показатели качества этилового спирта-сырца устанавливает ГОСТ 131-2013?

Лабораторная работа № 4

**БИОКОНВЕРСИЯ БЕЛКОВ РЫБНОГО СЫРЬЯ.
ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ (4 Ч)**

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по проведению биоконверсии белков рыбного сырья для получения белковых гидролизатов.

Задания:

- 1) освоить теоретический материал, представленный в разделе 4.2;
- 2) осуществить биоконверсию рыбного сырья при действии различных протеаз;
- 3) получить белковые гидролизаты;
- 4) исследовать показатели качества рыбных белковых гидролизатов, полученных с применением различных протеолитических ферментов.

**4.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ
ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

Приборы и оборудование: мясорубка; лабораторный шейкер или термостат; водяная баня; термометр; лабораторная центрифуга; лиофильная сушка; морозильная камера; сушильный шкаф; технические весы; аналитические весы; делительная воронка; центрифужные банки; центрифужные пробирки; тарелки для лиофильной сушки; колбы или банки с винтовыми крышками вместимостью 1000 см³; пипетки Пастера, шпатель; мерные колбы вместимостью 200 и 50 см³; конические колбы вместимостью 250 см³; мерный цилиндр на 50 см³; ступки; стеклянные воронки; пипетки градуированные объемом 20 см³; высушенный широкий бюкс; сито или сетчатый стакан; мерные цилиндры с притертыми пробками; линейки.

Материалы и реактивы: вода дистиллированная; вторичное рыбное сырье (головы, хребты, хвосты); ферментные препараты протеолитического действия; фенолфталеин; 0,1 н раствор гидроксида натрия; раствор с массовой долей формалина 37–40 %; масло подсолнечное; фильтровальная бумага.

1 Получение белковых гидролизатов при действии различных протеаз на рыбное сырье

Сравнивают процесс гидролиза белков рыбного сырья при использовании различных видов коммерческих протеаз.

Ход работы. Рыбное сырье измельчают с помощью мясорубки. В банку с винтовой крышкой или колбу вместимостью 1000 см³ с пробкой помещают

150–200 г сырья и приливают чуть меньше эквивалентного объема подогретой до температуры 60 °С дистиллированной воды. В стеклянном стаканчике на аналитических весах отвешивают ферментный препарат. Количество ферментного препарата рассчитывается, исходя из его активности (*по приложению В*).

С помощью оставшегося количества дистиллированной воды ферментный препарат без остатка переносят в тару с рыбным сырьем и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Тару закрывают крышкой или пробкой и помещают на лабораторный шейкер, либо в термостат при периодическом перемешивании. Температуру и продолжительность гидролиза устанавливают в зависимости от выбранного ферментного препарата. По окончании гидролиза емкость со смесью помещают в кипящую водяную баню для инактивации ферментов.

После инактивации гидролизат разделяют на фракции с помощью центрифуги. Центрифужную банку взвешивают на весах, фиксируют массу и заполняют гидролизатом. Масса банки вместе с гидролизатом не должна превышать 500 г. Для уравнивания оставшиеся банки заполняют водопроводной водой эквивалентной массы. Центрифугирование ведут при 3900 об/мин, при температуре 30 °С (для лучшего отделения жира), в течение 15 мин.

По окончании центрифугирования наблюдают четкое разделение гидролизата на три фракции:

- жир, который концентрируется сверху жидкой части;
- жидкую часть, содержащую продукты гидролиза белка;
- твердый осадок – негидролизовавшийся белок и минеральные компоненты.

Жидкую часть для обезжиривания переносят на делительную воронку. Банку взвешивают, фиксируя массу твердого осадка. Масса твердого осадка при использовании разных ферментных препаратов может различаться и указывать на глубину гидролиза сырья: чем больше масса твердого осадка, тем меньшую активность проявляет ферментный препарат. После отделения жира на делительной воронке также фиксируют массу жидкого обезжиренного гидролизата.

Жидкий гидролизат направляют на лиофильную сушку. Для этого используют специальные тарелки, которые предварительно взвешивают и маркируют. В тарелки разливают гидролизат слоем не более 2 см, фиксируют массу и помещают в морозильную камеру при температуре минус 18 °С. Тарелки с замороженным гидролизатом помещают на лиофильную сушку.

После высушивания тарелки вновь взвешивают и рассчитывают выход сухого гидролизата.

По результатам опыта 1 заполняют таблицу 4.1, в которой указывают выход жидкого гидролизата, выход твердого осадка при гидролизе рыбного сырья различными ферментными препаратами. Делают вывод об их эффективности.

Таблица 4.1 – Характеристика процесса биоконверсии белков рыбного сырья различными ферментными препаратами

Показатель	Значение при гидролизе ферментным препаратом:	
	<i>наименование и дозировка ферментного препарата</i>	...
Масса жидкого гидролизата		
Масса твердого остатка		
Масса сухого гидролизата		

2 Определение содержания аминного азота в белковых гидролизатах

Аминный азот является основным показателем, характеризующим содержание продуктов гидролиза белка (аминокислот, пептидов, пептонов) в гидролизате.

Ход работы. В мерную колбу объемом 200 см³ вносят 2–5 г сухого гидролизата и небольшое количество дистиллированной воды. Порошок растворяют и доводят объем до метки дистиллированной водой. Затем в коническую колбу отбирают 25 см³ раствора, прибавляют пять капель фенолфталеина и осторожно по каплям нейтрализуют 0,1 н раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. К нейтрализованному фильтрату добавляют 10 см³ 37–40%-ного формалина, после чего вновь титруют 0,1 н раствором гидроксида натрия. Замечают объем 0,1 н раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование пробы после добавления формалина.

Для определения кислотности формалина проводят холостой опыт. В коническую колбу приливают 25 см³ дистиллированной воды, 10 см³ формалина и титруют 0,1 н раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина до слабо-розового окрашивания.

Азот конечных аминогрупп (мг%) вычисляют по формуле:

$$N_{\text{ам}} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot 1,4 \cdot K \cdot V_2 \cdot 100}{m \cdot V_3}, \quad (4.1)$$

где V_1 – объем 0,1 н раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование рабочей пробы после добавления формалина, см^3 ; V_0 – объем 0,1 н раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование контрольной пробы, см^3 ; V_2 – объем мерной колбы, см^3 ; V_3 – объем пробы, взятой для титрования, см^3 ; 1,4 – количество аминного азота, соответствующее точно 1 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия; K – коэффициент нормальности раствора щелочи; m – масса навески гидролизата, г.

3 Определение растворимости гидролизата

Ход работы. Навеску сухого гидролизата массой 1 г взвешивают в стаканчике на аналитических весах и растирают в ступке с небольшим количеством дистиллированной воды (5 см^3). Через воронку растертую массу переносят количественно в мерную колбу объемом 50 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой.

Содержимое колбы переливают в колбу вместимостью 250 см^3 и перемешивают в течение 30 мин. После этого содержимое колбы переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 20 мин при скорости 1000 об/мин. Затем отбирают пипеткой 20 см^3 центрифугата и переносят в широкий предварительно высушенный и взвешенный бюкс. Бюкс помещают в сушильный шкаф и высушивают до постоянной массы.

Растворимость порошка в пересчете на сухое вещество (%) вычисляют по формуле:

$$P = \frac{m \cdot 100 \cdot V_0 \cdot 100}{V \cdot m_0 \cdot (100 - B)}, \quad (4.2)$$

где m – масса сухого остатка после высушивания 20 см^3 центрифугата, г; V_0 – объем мерной колбы, см^3 ; m_0 – масса навески белкового гидролизата, г; B – массовая доля влаги в белковом гидролизате, %.

4 Определение степени набухания гидролизата

Ход работы. Во взвешенное сито или сетчатый стакан (диаметр отверстий 1,5 мм) помещают 3–5 г гидролизата и погружают емкость в дистиллированную воду при комнатной температуре на 1 мин. Затем сито или стакан подвешивают для стекания излишков воды на 20 мин, обтирают наружные стенки и дно фильтровальной бумагой. Емкость взвешивают и определяют степень набухания порошка (%) по формуле:

$$C_H = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100, \quad (4.3)$$

где m_1 – масса емкости с порошком после замачивания, г; m_2 – масса емкости с порошком после замачивания, г.

5 Определение влагосвязывающей и жиросвязывающей способностей

Ход работы. Взвешивают пустую центрифужную пробирку и помещают в нее 1 г порошка. В пробирку вносят 25 см³ дистиллированной воды, тщательно размешивают порошок стеклянной палочкой и оставляют на 30 мин. После этого пробирку центрифугируют при скорости 2700 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную часть сливают, а пробирку переворачивают и помещают на фильтровальную бумагу для стекания остатков жидкости. Через 10 мин пробирку взвешивают и рассчитывают влагосвязывающую способность, выражая ее в г связанной воды на 1 г порошка по формуле:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{m_1 - m_0}, \quad (4.4)$$

где X – масса удержанной воды, г / 1 г порошка; m_0 – масса пустой пробирки, г; m_1 – масса пробирки с порошком, г; m_2 – масса пробирки с порошком со связанной водой.

Метод определения жиросвязывающей способности отличается тем, что к 1 г порошка добавляют 25 см³ подсолнечного масла.

6 Определение жироземмульгирующей способности

Ход работы. В мерный цилиндр с притертой пробкой помещают 3,5 г порошка, добавляют 50 см³ дистиллированной воды и 50 см³ подсолнечного масла. Эмульгирование проводят в течение 10 мин.

Жироземмульгирующую способность (%) рассчитывают по формуле:

$$\text{ЖЭС} = \frac{V_1}{V} \cdot 100, \quad (4.5)$$

где V_1 – объем эмульгированного масла, см³; V – общий объем добавленного масла, см³.

7 Определение пенообразующей способности

Ход работы. В цилиндр объемом 100 см³ с притертой пробкой вносят 0,5 г порошка и добавляют 30 см³ дистиллированной воды. Цилиндр закрывают пробкой и встряхивают в течение 10 мин. После этого отмечают высоту образовавшейся пены. Пенообразующую способность рассчитывают по формуле:

$$\text{ПОС} = \frac{h}{h_1} \cdot 100, \quad (4.6)$$

где h – высота пены, см; h_1 – высота общей смеси жидкости с пеной, см.

Стабильность пены определяют по формуле:

$$\text{СП} = \frac{h_2}{h} \cdot 100, \quad (4.7)$$

где h – высота исходной пены, см; h_2 – высота пены по прошествии 15 мин, см.

По результатам опытов 2–7 заполняют таблицу 4.2, характеризующую свойства рыбных белковых гидролизатов, полученных с применением различных протеолитических ферментных препаратов.

Таблица 4.2 – Характеристика рыбных белковых гидролизатов, полученных с применением различных ферментных препаратов

Показатель	Значение при гидролизе ферментным препаратом:	
	<i>наименование и дозировка ферментного препарата</i>	...
Внешний вид, цвет		
Вкус и запах		
Содержание аминного азота		
Растворимость		
Степень набухания		
Влагосвязывающая способность		
Жиросвязывающая способность		
Жироэмульгирующая способность		
Пенообразующая способность		
Стабильность пены		

4.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Реакция гидролиза белка катализируется ферментами – протеазами (рисунок 4.1).

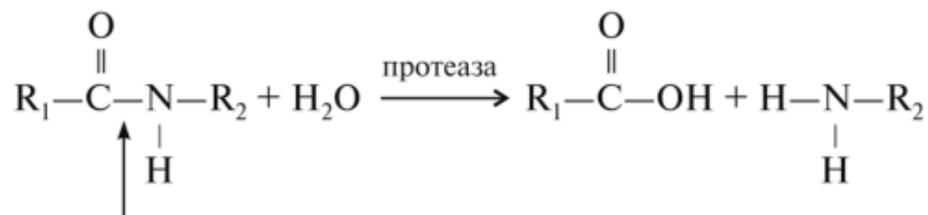


Рисунок 4.1 – Гидролиз белка

Протеазы среди всех промышленных ферментов являются наиболее изученными.

Степень гидролиза определяется как отношение числа расщепленных пептидных связей к их общему числу.

Протеазы классифицируют в зависимости от схожести с такими известными ферментами, как трипсин, химотрипсин, химозин и катепсин. Разделение протеаз на кислые, нейтральные и щелочные связано с их чувствительностью к значению рН. Протеазы имеют общеупотребительные (тривиальные) и торговые названия, различаются по специфичности и реакции на ингибиторы. В системе классификации ферментов все протеазы (пептидгидролазы) относятся к подклассу, который подразделяется на подподклассы: экзопептидазы, эндопептидазы (протеиназы). Эндопептидазы расщепляют внутренние пептидные связи в полипептидной цепи, а экзопептидазы отщепляют одну аминокислоту либо с N-конца (аминопептидазы), либо с C-конца (карбоксипептидазы).

Экзопептидазы, особенно аминопептидазы, широко распространены, однако в качестве промышленно выпускаемых продуктов малодоступны, поскольку многие из них являются внутриклеточными или мембраносвязанными ферментами. В зависимости от природы каталитического центра (сайта) протеиназы делят на четыре группы:

- кислотные или аспарагиновые;
- сериновые;
- тиольные или цистеиновые;
- металлопротеиназы.

Ферменты отличаются друг от друга также природой групп в каталитическом центре, субстратной специфичностью, реакцией на ингибиторы и активностью/стабильностью в кислых и основных средах.

Белки широко используются в пищевой промышленности. Их можно получать из различных сырьевых источников – молока, пшеницы, сои, мяса. Вместе с тем использование белков иногда ограничивается их свойствами. Для модификации свойств белков используют гидролиз. При гидролизе из высокомолекулярных белков образуются низкомолекулярные пептиды и аминокислоты, которые по питательности, а также по функционально-технологическим свойствам отличаются от исходного белка.

Общая схема переработки белкового сырья для получения гидролизатов состоит из следующих стадий:

- предварительная обработка сырья (измельчение) и внесение гидролизующего раствора (вода, буферный раствор);
- гидролиз в присутствии протеазы;
- остановка гидролиза тепловой обработкой;
- разделение фракций на жидкую, твердую и жировую;
- концентрирование жидкой фракции и формирование готовой формы продукта.

Для обеспечения наилучшего доступа фермента ко всем компонентам сырья и повышения выхода продукта сырье необходимо соответствующим образом измельчить. Для этого используют гомогенизацию, измельчение на волчке и дробилке (для костного сырья). Для контроля роста микроорганизмов подготовленную к гидролизу смесь пастеризуют. Температуру сырья регулируют в зависимости от температуры гидролиза. Температуру следует контролировать во избежание излишне интенсивного протекания реакции Майяра.

Остановка гидролиза, т. е. инактивация протеолитических ферментов, является одной из ключевых проблем гидролиза. После гидролиза температуру обычно повышают до 85–95 °С непрямым нагревом или введением пара. Можно использовать три типа нагревания:

- нагревание смеси в танке с паровой рубашкой;
- добавление горячей воды;
- прямое нагревание введением пара.

Альтернативой нагреванию по периодической технологии является пропускание гидролизата через пастеризатор непрерывного действия, однако, если фермент должен быть инактивирован через строго определенное время, то возникают определенные трудности.

Важной стадией технологического процесса получения белкового гидролизата является разделение, то есть отделение пептидов от реакционной среды. Смесь после гидролиза можно разделить на три фазы:

- жировая;

– осадок (частицы негидролизованного белка или других компонентов смеси относительно большого размера);

– водная, содержащая растворенный продукт.

Удаление жировой фазы наиболее эффективно осуществляется при высокой температуре (95 °С).

Разделение этих трех фаз осуществляется на специальном оборудовании, например, трехфазных декантерах, трехфазных центрифугах. Возможно использование двухфазных декантеров с последующим отделением жировой фазы.

Для удаления нежелательных веществ после разделения можно использовать дополнительные стадии, в частности:

– мембранное фильтрование, с помощью которого отделяются оставшиеся в ретентате высокомолекулярные пептиды от низкомолекулярных, которые проходят через фильтр и остаются в готовом продукте;

– изоэлектрическое осаждение, позволяющее удалить большую часть гидрофобных пептидов и сделать готовый продукт менее горьким;

– обработка активированным углем, способствующим удалению гидрофобных веществ.

Для повышения стабильности раствор белка необходимо сконцентрировать. Это можно сделать двумя способами:

– обратный осмос;

– выпаривание.

С помощью выпаривания можно получать очень концентрированные белковые растворы (до 50 % белка). Выпаривание обычно проводят в вакууме, что позволяет снизить температуру и тем самым уменьшить ее воздействие на готовый продукт. Вместе с тем нагревание белковых растворов, особенно концентрированных, способствует протеканию реакции Майяра, причем чрезмерное нагревание может привести к образованию нежелательного вкуса, аромата и горечи. Это необходимо учитывать при выборе режимов выпаривания.

Если предполагается длительное хранение продукта, то выпускаемая форма должна быть стабильной. Для сушки готовых продуктов обычно используют метод распылительной сушки. Гидролизованные белки высушить достаточно трудно, поскольку они гигроскопичны и могут образовывать комки. Во избежание этого в концентрированный гидролизат вносят определенные добавки, например, мальтодекстрины.

Функциональные свойства белковых гидролизатов существенно зависят от степени гидролиза. При ее увеличении благодаря образованию водородных связей между полярными фрагментами малых пептидов и водой повышается растворимость. Белковые гидролизаты обладают поверхностно-активными

свойствами, а благодаря гидрофильным и гидрофобным свойствам стабилизируют эмульсии типа «масло-в-воде». Очень высокими эмульгирующими свойствами и стабильностью обладают гидролизаты с ограниченной степенью гидролиза. Эффективно стабилизируют эмульсии высокомолекулярные пептиды и пептиды с гидрофобными свойствами, однако при чрезмерном гидролизе образуют короткие гидрофобные пептиды со слабыми эмульгирующими свойствами. Небольшие пептиды быстро мигрируют к поверхности, однако слабо снижают поверхностное натяжение и не стабилизируют эмульсии, поскольку на поверхности они не могут развертываться и переориентироваться. Чрезмерный гидролиз снижает и пенообразующие свойства, так как небольшие пептиды не обладают пеноудерживающими свойствами. Способность развернутых пептидов образовывать пену обусловлена их гидрофобностью. Стабильность пены зависит от природы пленки и отражает степень взаимодействия «белок-белок» в матрице.

Немаловажным свойством белковых гидролизатов является их вкус. Очищенные белки безвкусны. Вкус пептидов обусловлен двумя главными причинами: выделением в результате гидролиза вкусовых компонентов, «скрытых» в структуре белка, либо образованием мелких пептидов с относительно высоким содержанием горьких гидрофобных аминокислот. Вторая причина обуславливает проблему горечи белковых гидролизатов. На формирование горького вкуса оказывает влияние источник белка, выбранный для получения гидролизата; степень гидролиза, влияющая на концентрацию гидрофобных пептидов; специфичность фермента, образующего те или иные концевые аминокислоты в пептидах. Вкус белкового гидролизата можно регулировать за счет изменения степени гидролиза. Так, при высокой степени гидролиза (выше 15 %) горечь уменьшается за счет образования свободных аминокислот, придающих «бульонный» вкус. Примером может служить хорошо известный продукт – соевый соус, являющийся высокогидролизованным (выше 70 %) растительным белком. В таком гидролизате высоко содержание свободных аминокислот, особенно глутаминовой кислоты, отвечающей за вкус «умами», т. е. способность усиливать вкус пищевых продуктов.

В пищевой промышленности для получения белковых гидролизатов широко используется ферментный препарат класса эндопротеаз алкалаза (Alcalase), эффективно гидролизующий белки любого сырья. Недостатком этого ферментного препарата является образование горьких компонентов. Предотвратить образование горького вкуса возможно при использовании эндопротеаз совместно с экзопротеазами. Последние отщепляют аминокислоты от аминного или карбоксильного конца пептидов, которые зачастую являются гидрофобными. При их отщеплении пептиды утрачивают свою горечь.

Помимо функционально-технологических свойств рыбные белковые гидролизаты обладают широким спектром биологической активности. Так, они обладают антиоксидантными свойствами и ингибирующими свойствами по отношению к ангиотензинпревращающему ферменту, т. е. способствуют снижению артериального давления. В них присутствуют нейроактивные и иммуноактивные пептиды. Биоактивные пептиды высвобождаются из исходных пептидов в желудочно-кишечном тракте под действием протеолитических ферментов или при переработке пищевых продуктов. Пептиды-антиоксиданты препятствуют свободнорадикальной модификации ДНК, белков, липидов, а также малых клеточных молекул, которая приводит к различным патологиям – атеросклерозу, артритам, диабету, воспалительным процессам, неврологическим нарушениям. Биоактивность пептидов зависит от исходного белка и последовательности гидролиза, определяющейся видом используемых ферментов.

Контрольные вопросы

- 1) Что представляют собой протеазы? Каким образом их классифицируют?
- 2) Что является продуктами реакции гидролиза белка в присутствии протеаз?
- 3) Что такое степень гидролиза белка?
- 4) Каким образом можно осуществить инактивацию ферментного препарата в белковом гидролизате?
- 5) Какие три фазы необходимо разделить при получении белкового гидролизата? Каким образом это можно сделать?
- 6) Назовите функционально-технологические свойства белковых гидролизатов.
- 7) Чем обусловлена жирозэмульгирующая способность белковых гидролизатов? Как она связана со степенью гидролиза?
- 8) Каким образом определяется жирозэмульгирующая способность белковых гидролизатов?
- 9) От каких факторов зависит вкус белковых гидролизатов? Какие рациональные параметры гидролиза способствуют снижению горького вкуса?
- 10) Назовите ферментные препараты, которые вы использовали для получения гидролизатов в ходе лабораторной работы. Какой активностью они обладают, из каких источников получены?
- 11) Расскажите порядок действий при определении растворимости сухого белкового гидролизата.

Лабораторная работа № 5

**БИОКОНВЕРСИЯ НЕКРАХМАЛИСТЫХ УГЛЕВОДОВ
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (4 Ч)**

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по проведению биоконверсии некрахмалистых углеводов растительного сырья.

Задания:

- 1) освоить теоретический материал, представленный в разделе 5.2;
- 2) исследовать эффективность экстрагирования белка из бобового сырья при использовании различных ферментных препаратов;
- 3) исследовать влияние добавления ферментного препарата на эффективность выделения сока из плодового сырья;
- 4) исследовать процесс осветления яблочного сока различными методами, включая ферментативный.

**5.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ
ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

Приборы и оборудование: лабораторный шейкер или термостат; рН-метр; водяная баня; термометр; лабораторная центрифуга; холодильная камера; сушильный шкаф; технические весы; аналитические весы; фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; вакуумный насос; сахариметр; мерный цилиндр на 100 см³; колбы вместимостью 500 и 1000 см³ с пробками; колба Бунзена с воронкой Бюхнера; стаканы химические вместимостью 600 см³; пробирки вместимостью 20 и 50 см³; градуированные пипетки на 1 и 5 см³; стеклянные палочки; градуированная пробирка или мерная колба на 10 см³; широкий бюкс; терка; воронки.

Материалы и реактивы: вода дистиллированная; мука соевая, нутовая или гороховая; яблоки; ферментные препараты целлюлазной, пектиназной, ксиланазной, гемицеллюлазной активностей; раствор с массовой долей уксусной кислоты 9 %; раствор с массовой долей сульфата аммония 5 %; раствор мочевины (*по приложению Б*); биуретовый реактив (*по приложению Б*); реактив Шомоди и реактив Нельсона (*по приложению Б*); раствор с массовой долей лимонной кислоты 35 %; раствор с массовой долей желатина 1 %; раствор с массовой долей танина 1 %; бумажный фильтр высушенный до постоянной массы и взвешенный; марля.

1 Биоконверсия углеводов бобового сырья при выделении белка

Ход работы. В колбу вместимостью 500 см³ с пробкой вносят 20 г соевой, нутовой или гороховой муки и прибавляют 100 см³ подогретой до 50 °С дистиллированной воды. С помощью рН-метра измеряют водородный показатель смеси муки с водой и доводят его до 5,5 с помощью раствора с массовой долей уксусной кислоты 9 %.

На аналитических весах отвешивают ферментный препарат. Количество ферментного препарата рассчитывается в зависимости от проявляемой им активности (*по приложению В*).

Ферментный препарат вносят в колбу и хорошо перемешивают ее содержимое стеклянной палочкой. Колбу помещают на лабораторный шейкер или в термостат при периодическом перемешивании на 1 ч. Температура гидролиза зависит от используемого ферментного препарата.

Затем содержимое колбы переливают в стакан вместимостью 600 см³ и прибавляют 130 см³ раствора с массовой долей сульфата аммония 5 %. Смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 15 мин для экстрагирования белка.

Содержимое стакана разливают в центрифужные банки. Масса банки вместе с содержимым не должна превышать 500 г. Для уравнивания оставшиеся банки заполняют водопроводной водой эквивалентной массы. Центрифугирование осуществляют при скорости 500 об/мин в течение 10 мин.

Центрифугат, содержащий растворенный белок, собирают в чистый стакан, а твердый остаток отбрасывают.

2 Определение содержания белка в экстракте биуретовым методом

Ход работы. В пробирку объемом 20 см³ вносят 2,4 см³ раствора мочевины, 0,1 см³ фугата и 2,5 см³ биуретового реактива. Содержимое пробирки перемешивают и помещают на водяную баню с температурой 40 °С на 10 мин. Затем охлаждают до температуры 20 °С.

Через 30 мин после внесения биуретового реактива определяют оптическую плотность раствора при длине волны 545 нм. Количество белка определяют по предварительно построенной калибровочной кривой.

3 Определение содержания редуцирующих веществ в экстракте методом Шомоди-Нельсона

Ход работы. В градуированную пробирку или мерную колбу на 10 см³ вносят 1 см³ испытуемого раствора и 1 см³ реактива Шомоди, перемешивают, выдерживают на кипящей водяной бане 15 мин. Затем смесь охлаждают и при-

бавляют 1 см³ реактива Нельсона и доводят объем до 10 см³ дистиллированной водой.

Измеряют оптическую плотность раствора при 590 нм с использованием кюветы с шириной грани 5 мм. Содержание редуцирующих веществ находят по предварительно построенной калибровочной кривой.

4 Получение белкового изолята

Ход работы. К фугату, полученному в опыте № 1, осторожно по каплям прибавляют раствор с массовой долей лимонной кислоты 35 % до рН 4,4 по рН-метру. Наблюдают выпадающие в осадок белые хлопья белка. Осадку дают сформироваться в течение 15 мин. Для лучшего осаждения стакан с фугатом помещают в холодильную камеру.

Осадок отделяют вакуумным фильтрованием через предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный складчатый фильтр с помощью колбы Бунзена и воронки Бюхнера. Фильтр с осадком помещают в широкий бюкс, высушивают в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре 103–105 °С и взвешивают.

По результатам 2–4 заполняют таблицу 5.1, сравнивая содержание белка и редуцирующих веществ в фугате, выход белкового изолята из бобового сырья при действии на него различных ферментных препаратов.

Таблица 5.1 – Эффективность биоконверсии некрахмалистых углеводов растительного сырья при выделении белка

Показатель	Значение, полученное при проведении биоконверсии ферментным препаратом:	
	наименование и дозировка ферментного препарата	...
Массовая доля белка в экстракте		
Массовая доля редуцирующих веществ в экстракте		
Масса белка, отделенного фильтрованием		

5 Биоконверсия яблочного сырья при получении сока

Ход работы. Яблоки измельчают с помощью терки. В две колбы вместимостью 1000 см³ помещают по 500 г измельченного яблочного сырья, закрывают пробками и подогревают на водяной бане до температуры 50 °С. В од-

ну колбу вносят ферментный препарат, предварительно отвешенный в маленьком стаканчике на аналитических весах. Количество ферментного препарата устанавливают в зависимости от проявляемой активности (*по приложению В*).

Содержимое колб перемешивают стеклянной палочкой и помещают в термостат при 50 °С при периодическом перемешивании или на лабораторный шейкер. Гидролиз ведут в течение 30 мин.

Затем содержимое колб фильтруют через марлю и измеряют объем полученного сока. Делают вывод о влиянии добавления ферментного препарата на выход яблочного сока.

По результатам опыта 5 заполняют таблицу 5.2 и оценивают эффективность отделения сока при использовании различных ферментных препаратов.

Таблица 5.2 – Эффективность биоконверсии углеводов яблочного сырья при отделении сока

Опыт	Выход сока, % от массы яблочного сырья
Контрольный опыт	
Опыт с использованием ферментного препарата: - <i>наименование и дозировка ферментного препарата</i> - ...	

6 Сравнение методов осветления яблочного сока

Сравнивают эффективность различных способов осветления сока: обработкой ферментным препаратом пектолитического действия, оклейкой танином и желатином, комбинированным методом.

Ход работы. В три пробирки помещают по 30 см³ яблочного сока, полученного в контрольном эксперименте опыта № 5 (без использования ферментного препарата). Первую пробирку с соком подогревают на водяной бане до температуры 45 °С и вносят ферментный препарат «Пектиназа» в количестве 0,03 %. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и помещают в термостат при температуре 50 °С на 1 ч. Затем содержимое переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 20 мин при частоте 2700 об/мин.

Во вторую пробирку с соком вносят 0,6 см³ раствора с массовой долей танина 1 %, взбалтывают и вносят 1 см³ раствора с массовой долей желатина

1 %. Пробирку взбалтывают в течение 15 мин, наблюдая за эффектом осветления. Осветленный сок центрифугируют, как в случае с первой пробиркой.

Третью пробирку с соком подогревают на водяной бане до температуры 45 °С, добавляют 0,03 % ферментного препарата «Пектиназа», тщательно перемешивают и помещают в термостат при температуре 50 °С на 30 мин. После этого вносят 1 см³ раствора с массовой долей желатина 1 %. Пробирку хорошо взбалтывают и выдерживают еще 30 мин при комнатной температуре. Затем центрифугируют, как в случае с первой пробиркой.

В трех образцах сока, полученных с применением разных способов осветления, определяют содержание сухих веществ по сахарметру и прозрачность с помощью фотоэлектроколориметра или спектрофотометра при длине волны 364 нм.

По результатам опыта 6 заполняют таблицу 5.3 и оценивают эффективность осветления яблочного сока различными способами.

Таблица 5.3 – Влияние методов осветления на качество яблочного сока

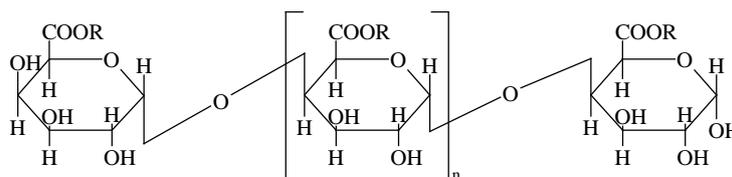
Способ осветления	Условия процесса			Качество сока		
	осветляющий материал и его дозировка	температура	продолжительность	визуальная прозрачность	оптическая плотность при длине волны 364 нм	содержание сухих веществ по сахариметру
...						

5.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Пектины, целлюлоза и гемицеллюлозы являются основными полисахаридами растительной клеточной стенки.

Пектиновые вещества – высокомолекулярные соединения, обладающие свойствами лиофильных коллоидов. Пектины представляют собой полисахариды клеточных стенок. Основным компонентом пектиновых полисахаридов являются полиуроновые кислоты. У высших растений они состоят из остатков D-галактуроновой кислоты, связанных С-1→С-4-связями, на долю которой в зависимости от источника происхождения пектиновых веществ приходится от 83 до 90 %.

Карбоксильная группа каждого остатка D-галактуроновой кислоты может существовать в разных состояниях: образовывать соли с ионами определенных металлов, чаще всего кальция (пектат), причем атомы двух- и трехвалентных металлов могут связывать несколько цепей полигалактуроновой кислоты; соль может быть одновременно и метоксилирована (пектинат), или оставаться немодифицированной (пектовая кислота – основа всех видов пектиновых веществ), или быть частично метоксилированной (эту форму обычно называют пектином):



	R
Пектовая кислота	H
Пектат	Me ⁺
Пектин	H и CH ₃
Пектинат	Me ⁺ и CH ₃

Незначительную часть в составе пектиновых веществ составляют нейтральные полисахариды – арабинаны и галактаны, что и обуславливает гетерополисахаридный характер пектина. Арабинаны представляют собой разветвленные полимеры, состоящие из остатков L-арабофуранозы, соединенные между собой α -C-1→C-5-связями. Галактаны – неразветвленные цепи, образованные из остатков D-галактопиранозы, соединенных β -C-1→C-4-связями. При этом возможно, что часть карбоксильных групп галактуроновой кислоты этерифицирована указанными нейтральными полисахаридами. Молекулярная масса пектиновых веществ достигает 200000.

Согласно современным представлениям пектин имеет линейную структуру, в которой остатки D-галактуроновой кислоты имеют пиранозную конфигурацию (рисунок 5.1, а).

Используют и другой способ изображения молекулы пектина, в котором отдельные кольца повернуты относительно друг друга и лежат в различных плоскостях (рисунок 5.2, б).

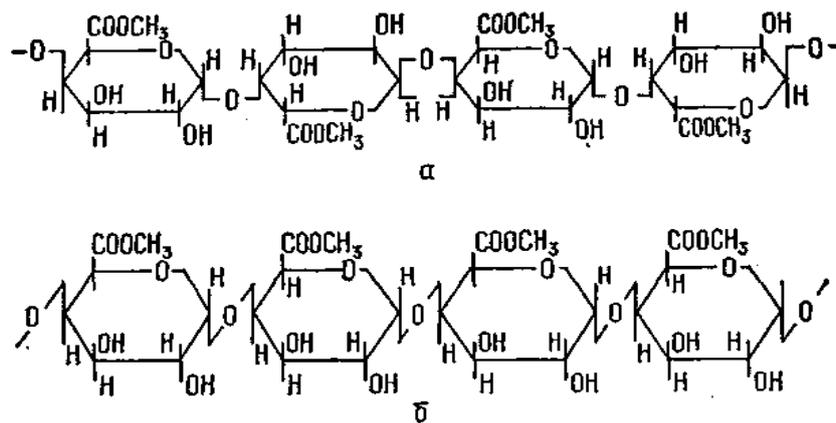


Рисунок 5.1 – Структурная формула пектина

В течение длительного времени не существовало четко сформулированной номенклатуры пектиновых веществ. В литературе применялось около 50 различных терминов. В настоящее время утвердилась следующая номенклатура пектиновых веществ, разработанная Комитетом Американского химического общества и официально принятая в 1944 г.:

– пектин (pectin) – водорастворимое вещество, свободное от целлюлозы и состоящее из частично или полностью метоксилированных остатков полигалактуроновой кислоты. В зависимости от количества метоксильных групп и степени полимеризации существуют различные пектины. Н-пектин (H-pectin) – высокоэтерифицированный пектин. Имеет степень этерификации, т. е. отношение числа этерифицированных карбоксильных групп на каждые 100 карбоксильных групп пектиновой кислоты, более 50 %; L-пектин (L-pectin) – низкоэтерифицированный пектин. Имеет степень этерификации менее 50 %;

– пектиновые вещества (pectic substances) – физические смеси пектинов с сопутствующими веществами (например, пентозанами и гексозанами);

– пектиновые кислоты (pectin acid) – высокомолекулярные полигалактуроновые кислоты, небольшая часть карбоксильных групп которых этерифицирована метиловым спиртом. Соли пектиновых кислот называются нормальными или кислыми пектинатами (pectinates);

– пектовые кислоты (pectic acid) – полностью деметоксилированные пектины с нетронутыми цепями. Соли пектовых кислот называются нормальными или кислыми пектатами (pectates);

– протопектин (protopectin) – нерастворимый в воде природный пектин растений, состоящий в основном из сети пектиновых цепей, образованных в результате соединения многовалентных ионов металла с неэтерифицированными группами COOH (образование ионных мостиковых связей), и в незначительном количестве при помощи эфирных мостиков с H_3PO_4 ;

– производные пектина – пектины с различными группами, связанными по главным валентностям, например ацетилпектин.

Структура и химический состав пектиновых веществ определяют пространственную форму их молекул и характер взаимодействия с другими соединениями. Установлено, что пектиновые вещества обладают структурой с ограниченной гибкостью, стабилизируемой водородными и гидрофобными связями (рисунок 5.2).

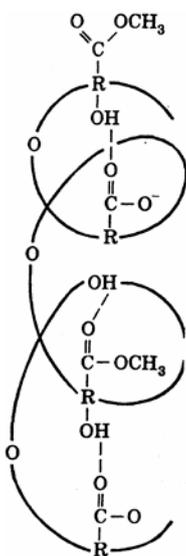


Рисунок 5.2 – Пространственная структура молекулы пектина

Пектиновые вещества разрушаются ферментами пектиназами. Все пектиназы условно можно разделить на две группы: гидролазы и трансэлиминазы. К гидролазам относят пектинэстеразу и полигалактуроназу (рисунок 5.3). Пектинэстераза (пектинметилэстераза) представляет собой гидролазу эфиров карбоновых кислот. Фермент омыляет сложные эфирные связи в пектиновой кислоте и пектине и отщепляет метиловый спирт. В результате действия пектинэстеразы накапливаются частично или полностью деметоксилированная полигалактуронозная кислота и метиловый спирт. Полигалактуроназа (полигалактуронидгликоногидролаза) осуществляет гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей в цепи пектиновых веществ.

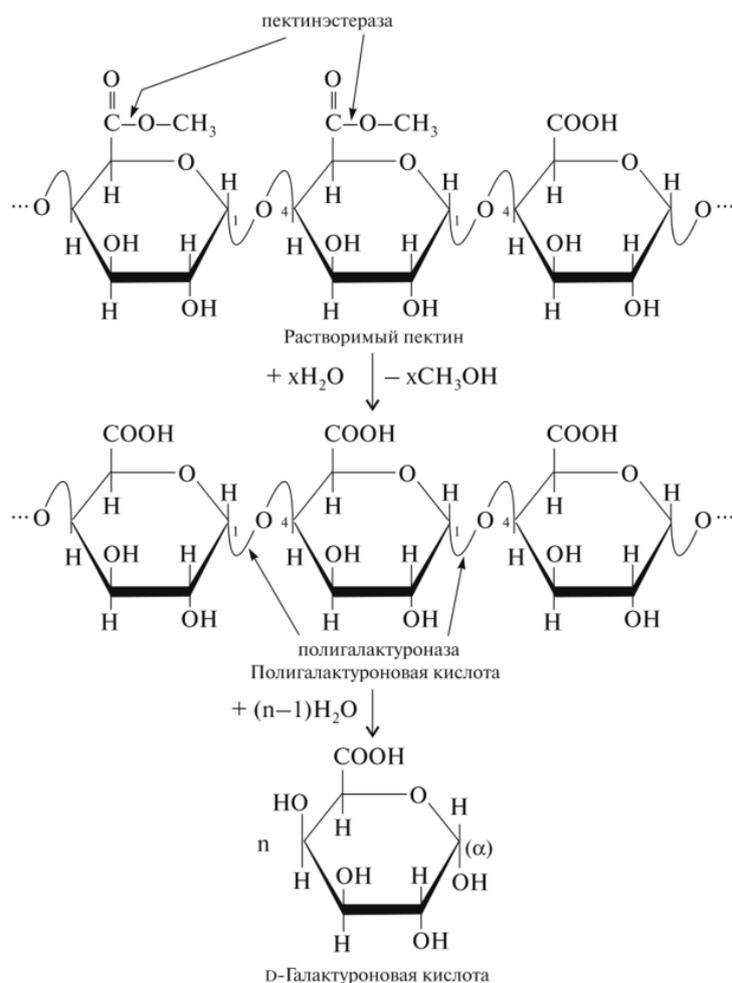


Рисунок 5.3 – Гидролиз пектиновых веществ

Целлюлоза является высокополимерным полисахаридом растений, состоящим из остатков глюкозы, соединенных между собой β -1,4-глюкозидными связями (рисунок 5.4).

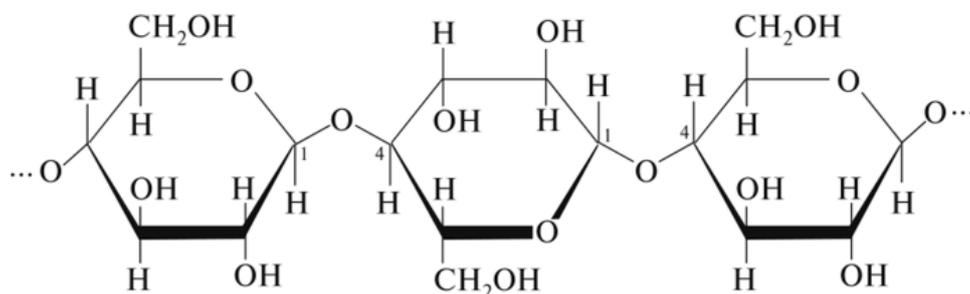


Рисунок 5.4 – Строение целлюлозы

Ферменты, осуществляющие гидролиз целлюлозы, называются целлюлазами. Целлюлоза является не растворимым в воде субстратом. Нативная целлюлоза медленно и плохо атакуется целлюлазами. Поэтому целлюлозу для

ферментативного гидролиза необходимо подвергать предварительной обработке. Для этого применяют измельчение с помощью вальцевания материала в различных типах мельниц, химические способы обработки кислотами и щелочами, методы физической обработки и т. д. В связи с этим при характеристике целлюлолитических ферментов обязательно учитывают состояние субстрата – целлюлозы. Различают два вида целлюлозы:

– нативная – ничем не обработанная целлюлоза, которая полностью сохранила исходное строение и структуру микрофибрилл (хлопок, фильтровальная бумага), и так называемая

– модифицированная, частично обработанная целлюлоза, в которой нарушены водородные связи и фибриллярная структура волокна.

К комплексу целлюлаз, участвующих в деструкции целлюлозы, относят:

1) 1,4-β-D-глюкан-4-глюканогидролазы. Это эндоглюканаза, способная неупорядоченно гидролизовать в целлюлозе β-1,4-связи, помимо целлоолигосахаридов могут образовываться в реакционной среде глюкоза и целлотриозы;

2) 1,4-β-D-глюканглюкогидролаза. Это экзо-1,4-β-глюкозидаза, которая гидролизует 1,4-связи в 1,4-β-D-глюканах с последовательным отщеплением глюкозных остатков;

3) 1,4-β-D-глюканцеллобиогидролаза. Это целлобиогидролаза, которая отщепляет целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов;

4) β-D-глюкозидглюкогидролаза. Это β-глюкозидаза, или целлобиаза, которая гидролитически отщепляет концевые нередуцирующие остатки β-D-глюкозы с освобождением молекулы глюкозы (рисунок 5.5).

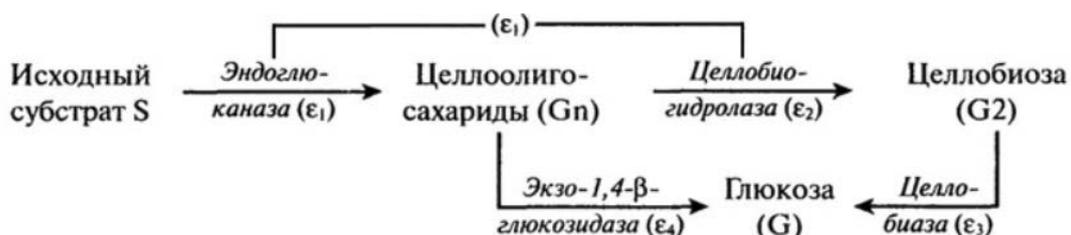


Рисунок 5.5 – Схема гидролиза целлюлозы

Гемицеллюлозы. Гемицеллюлозами в отличие от целлюлоз называются те полисахариды клеточных оболочек, которые растворяются в концентрированных щелочах (17%-ный раствор NaOH и 24%-ный KOH). Гемицеллюлозы наряду с пектиновыми веществами образуют основное вещество (матрикс) клеточных оболочек. Из всех гемицеллюлоз только очень немногие виды ксиланов, глюканов и маннанов имеют фибриллярное строение, например, глюкоманнаны некоторых водорослей. Остальные же гемицеллюлозы имеют ветвистое строение и поэтому не могут образовывать фибриллы. Эта группа полисахаридов,

разнородная по строению, молекулярной массе и составу, при гидролизе дает довольно разнообразный набор соединений: глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу, ксилозу, арабинозу, глюкуроновую и галактуоновую кислоты. Гидролиз гемицеллюлозы происходит под действием гемицеллюлолитических ферментов.

Все гемицеллюлозные вещества делят на две группы: β -глюканы и пентозаны. β -Глюканы являются высокомолекулярными полимерами и при полном гидролитическом расщеплении образуют одну глюкозу (рисунок 5.6). β -Глюканы широко распространены в природе. Они входят в состав многих растений, водорослей, мхов, лишайников и микроорганизмов.

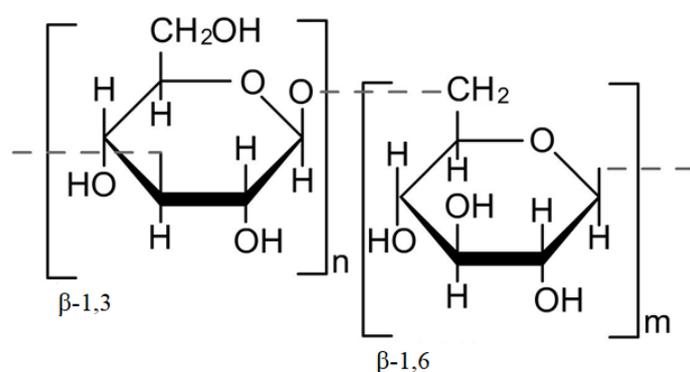


Рисунок 5.6 – Строение β -глюкана

Пентозаны имеют ветвистое строение, они состоят из остатков ксилоз, арабиноз и небольшого количества остатков галактуоновой кислоты. Основной тип связей – β -1,4-, а в местах ветвления – β -1,3-связь. В концевой цепи ветвлений могут быть остатки арабинозы. Наиболее известным представителем этой группы является ксилан (рисунок 5.7).

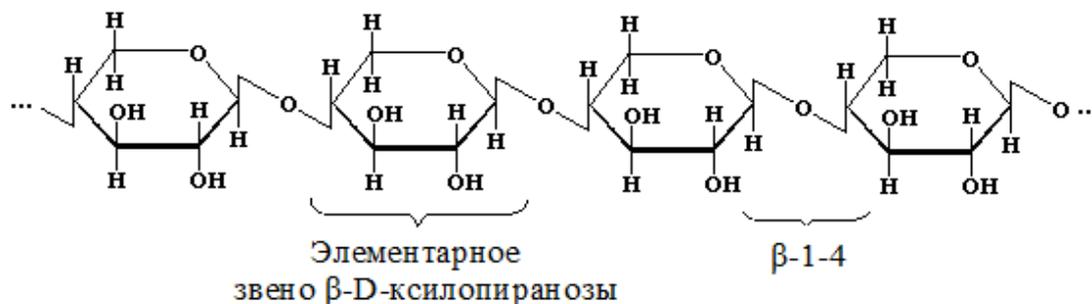


Рисунок 5.7 – Строение ксилана

Все гемицеллюлазные ферменты делят на три группы: β -D-глюканы, β -ксилазы и β -глюкозидазы.

К β -D-глюканазам относят систему ферментов, катализирующую расщепление β -глюканов с β -1,2-, β -1,3-, β -1,4- и β -1,6-связями. β -D-Глюканазы – весьма разнородный комплекс ферментов, составляющие которого отличаются по многим признакам. Молекулярные массы, изоэлектрические точки, гидролитические способности этих ферментов, по данным различных исследователей, сильно различаются. Объединяет же всю эту группу их способность к гидролитическому расщеплению внутримолекулярных глюкозидных связей в β -глюканах различного происхождения.

К β -ксилазнам относится система ферментов, катализирующих расщепление β -глюкозидных связей в β -ксиланах. К этой группе можно отнести несколько ферментов: 1,4- β -D-ксиланксианогидролаза (эндо-1,4-ксилаза) катализирует реакцию гидролитического расщепления 1,4- β -ксилозидных связей в ксиланах; 1,3- β -D-ксиланксианогидролаза (ксилаза) беспорядочно гидролитически расщепляет внутримолекулярные 1,3- β -D-ксилозидные связи в 1,3- β -D-ксиланах; 1,4- β -D-ксиланксианогидролаза (экзо-1,4- β -ксилозидаза, ксилобиаза, β -ксилозидаза) гидролизует 1,4- β -D-ксиланы путем последовательного отщепления с нередуцирующего конца молекулы полисахарида остатка D-ксилозы.

β -Глюкозидазы известны под названиями: генциобиаза, амигдалаза и самое распространенное – целлобиаза. β -Глюкозидаза – это фермент экзогенного действия. Она гидролитически расщепляет последнюю с нередуцирующего конца β -1,4-связь в β -D-глюкозидах, высвобождая β -D-глюкозу. β -Глюкозидаза проявляет широкую субстратную специфичность. Некоторые ферменты этой группы гидролизуют не только β -D-глюкозиды, но и β -D-галактозиды, α -L-арабинозиды или β -D-ксилозиды.

Ферменты, разрушающие некрахмалистые полисахариды растительного сырья находят применение при получении белковых изолятов из побочных продуктов переработки зерновых культур. Применяют ферментные препараты цитолитического, пектолитического и гемицеллюлазного действия, облегчающие доступ растворителей к белку. Результатом является повышение выхода препаратов с 9–11 до 11–14 % к массе сырья.

Ферменты также находят применение при экстракции сока из овощного и плодово-ягодного сырья. Присутствие пектина является основным фактором, затрудняющим отделение сока. Будучи гидроколлоидом, обладающим большим сродством к воде, пектин растворяется в соке и повышает его вязкость. Кроме того, при повышении концентрации сахара на стадии выпаривания сока пектин образует гели. Гидролиз пектина облегчает экстракцию сока и увеличивает его выход. Таким образом, снижается количество отходов (выжимок) и содержание

в них влаги. Наиболее целесообразным является использование ферментов при получении яблочного сока.

Контрольные вопросы

- 1) Что представляют собой протеазы? Каким образом их классифицируют?
- 2) Что является продуктами реакции гидролиза белка в присутствии протеаз?
- 3) Что такое степень гидролиза белка?
- 4) Каким образом можно осуществить инактивацию ферментного препарата в белковом гидролизате?
- 5) Какие три фазы необходимо разделить при получении белкового гидролизата? Каким образом это можно сделать?
- 6) Назовите функционально-технологические свойства белковых гидролизатов.
- 7) Чем обусловлена жироземмульгирующая способность белковых гидролизатов? Как она связана со степенью гидролиза?
- 8) Каким образом определяется жироземмульгирующая способность белковых гидролизатов?
- 9) От каких факторов зависит вкус белковых гидролизатов? Какие рациональные параметры гидролиза способствуют снижению горького вкуса?
- 10) Назовите ферментные препараты, которые вы использовали для получения гидролизатов в ходе лабораторной работы. Какой активностью они обладают, из каких источников получены?
- 11) Расскажите порядок действий при определении растворимости сухого белкового гидролизата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова, Л. А. Пищевая биотехнология: учеб. пособие: в 2 кн. / Л. А. Иванова, Л. И. Войно, И. С. Иванова; ред. И. М. Грачева. – Москва: КолосС, 2008. – Кн. 2. Переработка растительного сырья. – 472 с.
2. Машанов, А. И. Биоконверсия растительного сырья / А. И. Машанов, Н. А. Величко, Е. Е. Ташлыкова. – Красноярск: Изд-во Краснояр. гос. аграр. ун-та, 2014. – 223 с.
3. Муратова, Е. И. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учеб. пособие / Е. И. Муратова, О. В. Зюзина, О. Б. Шуняева. – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007. – 80 с.
4. Неверова, О. А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения [Электронный ресурс]: учебник / О. А. Неверова, Г. А. Гореликова, В. М. Позняковский. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 416 с.
5. Никифорова, Т. А. Биоконверсия растительного сырья [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Т. А. Никифорова, Е. В. Волошин; Министерство образования и науки Российской Федерации, Оренбургский государственный университет. – Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2017. – 130 с.
6. Практикум по общей биохимии: учеб. пособие / Е. В. Романовская, Т. В. Гришина, И. Е. Красовская [и др.]; под ред. Е. В. Романовской, Н. Д. Ещенко. – Санкт-Петербург: СПбГУ, 2010. – 194 с.
7. Рабинович, В. А. Краткий химический справочник: Справ. изд. / под ред. А. А. Потехина и А. И. Ефимова. – 4-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Химия, 1994. – 432 с.
8. Сергачева, Е. С. Анализ сырья для производства хлебобулочных и кондитерских изделий: учеб.-метод. пособие / Е. С. Сергачева, Е. В. Соболева. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО; ИХиБТ, 2015. – 100 с.
9. Сидоренко, О. Д. Биоконверсия отходов агропромышленного комплекса / О. Д. Сидоренко, В. Н. Кутровский. – Москва: НИЦ Инфра-М, 2013. – 160 с.
10. Смирнова, И. Р. Пищевые и биологически активные добавки к пище [Электронный ресурс]: учеб. пособие / И. Р. Смирнова, Ю. М. Плаксин; Российская международная академия туризма. – Москва: Логос, 2012. – 134 с.
11. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс: пер. с англ. – Москва: Мир, 1991. – 544 с.
12. Степовой, А. В. Технология и экспертиза бродильных производств: лабораторный практикум / А. В. Степовой, Л. Я. Родионова, А. А. Варивода. – Краснодар: КубГАУ, 2017. – 82 с.

13. Степычева, Н. В. Введение в технологию продуктов питания: Лабораторный практикум / Н. В. Степычева. – ГОУВПО Иван. гос. хим.-технол ун-т. – Иваново, 2007. – 48 с.

14. Уайтхерст, Р. Дж. Ферменты в пищевой промышленности / Р. Дж. Уайтхерст, М. ван Оорт / пер. с англ. С. В. Макарова. – Санкт-Петербург: Профессия, 2013. – 408 с.

15. Шлейкин, А. Г. Биохимия: Лабораторный практикум: учеб. пособие: в 3 ч. / А. Г. Шлейкин, Н. Н. Скворцова, А. Н. Бландов. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО; ИХиБТ, 2015. – Ч. 1. Методические основы и правила работы в лаборатории биохимии. – 70 с.

16. Шлейкин, А. Г. Биохимия: Лабораторный практикум: учеб. пособие: в 3 ч. / А. Г. Шлейкин, Н. Н. Скворцова, А. Н. Бландов. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2015. – Ч. 3. Углеводы. Липиды. – 64 с.

17. Шлейкин, А. Г. Основы биоконверсии: учеб.-метод. пособие / А. Г. Шлейкин. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2015. – 57 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А к лабораторной работе № 1

Приготовление вытяжки из солода. 20 г измельченного солода растирают в ступке с небольшим количеством воды до однородной массы и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, объем доводят водой до метки, содержимое перемешивают и оставляют на льду на 1,5–2 ч. По истечении времени экстрагирования содержимое перемешивают и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин.

Приготовление ацетатного буфера рН 5,5. К 57,4 см³ раствора с концентрацией уксусной кислоты 1 моль/дм³ добавляют 50 см³ раствора с концентрацией гидроксида натрия 1 моль/дм³ и общий объем доводят водой до 500 см³.

Приготовление раствора с массовой долей йода 0,3 % в растворе с массовой долей йодида калия 3 %. 0,3 г йода кристаллического и 3 г йодида калия смешивают с 3–5 см³ дистиллированной воды и после растворения йода объем доводят дистиллированной водой до 100 см³.

Приложение Б к лабораторной работе № 5

Приготовление раствора мочевины. К 75 г мочевины добавляют кусочек тимола объемом примерно 3 мм³, приливают 200 см³ воды и смесь нагревают для растворения мочевины. Далее добавляют 0,8 г активированного угля, все содержимое тщательно перемешивают и фильтруют в мерную колбу на 250 см³, объем доводят до метки дистиллированной водой.

Приготовление биуретового реактива. К 100 см³ 0,2 н. раствора гидроксида натрия прибавляют 2,25 г калия натрия виннокислого, после растворения добавляют 1,25 г йодистого калия и объем доводят до 250 см³ 0,2 н. раствором гидроксида натрия.

Построение калибровочной кривой для определения содержания белка биуретовым методом. Для этого готовят водные растворы с содержанием 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мг белка в 10 см³ раствора. Для построения калибровочной кривой из полученных растворов отбирают в пробирки по 0,2 см³, добавляют 4,8 см³ раствора мочевины, выдерживают 10 мин и добавляют 5 см³ биуретового реактива, дальше поступают так же, как при определении содержания белка в вытяжке (см. ход анализа). Количество белка рассчитывают в мкг/см³.

Приготовление реактива Шомоди. Реактив Шомоди состоит из двух растворов.

1-й раствор: 24 г карбоната натрия и 12 г тартрата калия-натрия (калий натрий виннокислый средний) помещают в коническую колбу вместимостью 500 см³ и добавляют 250 см³ дистиллированной воды. Затем приливают 40 см³ раствора с массовой долей сульфата меди 10 %, перемешивают и добавляют 16 г гидрокарбоната натрия.

2-й раствор: 18 г сульфата натрия растворяют в 500 см³ горячей дистиллированной воды. Раствор кипятят в течение 40 мин для удаления СО₂, затем охлаждают.

Оба раствора смешивают в мерной колбе на 1 дм³, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. В течение первых 2–3 сут хранения реактива Шомоди оседает небольшое количество меди с примесями. Этот осадок отфильтровывают, готовый раствор хранят в темной склянке.

Приготовление реактива Нельсона. 25 г молибдата аммония помещают в мерную колбу на 500 см³ и растворяют в 150 см³ дистиллированной воды. Раствор перемешивают, осторожно небольшими порциями прибавляют 21 см³ концентрированной серной кислоты при непрерывном перемешивании.

3 г гептагидрата гидроортоарсената натрия ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) растворяют отдельно в химическом стакане в 50 см^3 дистиллированной воды и приливают к приготовленному ранее раствору в мерную колбу. Получается прозрачный раствор светло-желтого цвета, его доводят до метки и выдерживают в термостате при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 2 сут. После выдержки раствор готов к употреблению.

Построение калибровочной кривой для определения содержания редуцирующих сахаров методом Шомоди-Нельсона. Калибровочную кривую строят после проведения колориметрической реакции при 590 нм модельных раствором глюкозы с концентрацией от 0,02 до 0,14 мг/см³. Изучаемая зависимость выражается прямой линией, выходящей из начала координат.

Приложение В

Характеристика некоторых ферментных препаратов, использующихся в лабораторных работах

Алкалаза, Alcalase (эндопротеаза).

Продуцент: *Bacillus licheniformis*.

Активность: Катализирует гидролиз высокомолекулярных белков с образованием низкомолекулярных пептидов. Активность 2,5 единиц Ансона /г.

Оптимальные условия действия: рН 7,0–10,0; температура 30–65 °С.

Амилосубтилин (α -амилаза, β -глюканаза, ксиланаза).

Продуцент: *Bacillus subtilis*.

Активность: Амилазная активность 1500 ед/г, глюканазная – 500 ед/г; ксиланазная – 100 ед/г

Оптимальные условия действия: рН 5,0–8,0; температура 50–75 °С.

Вискозим, Viscozyme (арабиназа, целлюлаза, β -глюканаза, гемицеллюлаза, ксиланаза).

Продуцент: *Aspergillus sp.*

Активность: 100 единиц грибной эндоглюканазы / г.

Оптимальные условия действия: рН 4,5–6,0; температура 35–65 °С.

β -Глюканаза (эндо- β -1,4-глюканаза).

Продуцент: *Myceliophthora fergusii*.

Активность: Катализирует разрушение β -глюканов и целлюлозы зернового сырья путем гидролиза β -1,4-глюкозидных связей. Активность 10000 ед/мл.

Оптимальные условия действия: рН 4,0–4,5; температура 65–70 °С.

Глюкаваморин (глюкоамилаза, декстриназа, мальтаза, альфа-амилаза, гемицеллюлаза, целлюлаза).

Продуцент: *Aspergillus awamori*.

Активность: Расщепляет молекулы декстринов и крахмала с образованием глюкозы. Активность 3000 ед/г.

Оптимальные условия действия: рН 4,0–5,5; температура 30–60 °С.

Ксиланаза (4-D-D-ксилан ксиланогидролаза).

Продуцент: *Penicillium sp.*

Активность: Катализирует случайный гидролиз внутренних 1-4-связанных β -D-ксилозидных связей в ксиланах. Активность 10000 ед/г.

Оптимальные условия действия: рН 5,5–6,7; температура 50–60 °С.

Пектиназа (эндо- α -1,4-полигалактуроназа, экзо- α -1,4-полигалактуроназа).

Продуцент: *Aspergillus foetidus*.

Активность: Катализирует гидролиз внутренних 1-4-связанных α -D-галактуронозидных связей в основной цепи полигалактуронатов и пектиновых субстратов с низкой степенью метиловой этерификации. Активность 35 ед/г.

Оптимальные условия действия: pH 4–4,5; температура 35–45 °C.

Протозим (протеаза).

Продуцент: *Bacillus licheniformis*.

Активность: Катализирует гидролиз высокомолекулярных белков с образованием низкомолекулярных пептидов. Активность 50000 ед/г.

Оптимальные условия действия: pH 6,0–10,0; температура 55–65 °C.

Флаворзим, Flavourzyme (смесь эндо- и экзопротеаз).

Продуцент: *Aspergillus oryzae*.

Активность: Катализирует гидролиз высокомолекулярных белков с образованием низкомолекулярных пептидов. Активность 500–100 единиц лейцинаминопептидазы / г.

Оптимальные условия действия: pH 4,0–8,0; температура 30–65 °C.

Учебное издание

Светлана Викторовна Агафонова
Евгения Сергеевна Землякова

БИОКОНВЕРСИЯ И БИОКАТАЛИЗ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Редактор Е. Билко

Подписано в печать 28.10.2022 г. Формат 60 × 90 1/16. Уч.-изд. л. 4,8.
Печ. л. 4,7. Тираж 10 экз. Заказ № 68

Издательство федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет».
236022, Калининград, Советский проспект, 1