МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет
имени И. Т. Трубилина»

А. А. Нестеренко, Н. В. Кенийз

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И ФИЗИКА МЯСА И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Лабораторный практикум

Краснодар
КубГАУ
2020

УДК 637.5.04/07(075.8)
ББК 63.92
Н56

Р е ц е н з е н т:

Р. С. Омаров – канд. техн. наук, доцент
(Ставропольский государственный университет)

Нестеренко А. А.

Н56 Технологическая химия и физика мяса и мясных продуктов : лабораторный практикум / А. А. Нестеренко, Н. В. Кенийз. – Краснодар : КубГАУ, 2020. – 161 с.

В лабораторном практикуме приведены теоретические данные и лабораторные занятия по дисциплине «Технологическая химия и физика мяса и мясных продуктов».

Предназначен для обучающихся по направлению подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции.

УДК 637.5.04/07(075.8)
ББК 63.92

© Нестеренко А. А., Кенийз Н. В., 2020
© ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина», 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ 7
ГЛАВА 1. СОСТАВ, СВОЙСТВА И СТРУКТУРА МЯСА 8
Лабораторная работа № 1 Идентификация качественного состава мясных изделий 23
ГЛАВА 2. ИЗМЕНЕНИЯ МЯСНОГО СЫРЬЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ 29
Лабораторная работа № 1 Оценка глубины и характера автолитических превращений мышечной ткани методами биохимического анализа небелковых веществ 47
Лабораторная работа № 2 Определение активности катепсинов мышечной ткани 53
Лабораторная работа № 3 Определение компонентов системы свертывания крови 56
Лабораторная работа № 4 Определение молокосвертывающей активности пепсина 60
Лабораторная работа № 5 Определение инсулина поджелудочной железы 63
Лабораторная работа № 6 определение гормонов щитовидной железы и надпочечников 68
ГЛАВА 3. ВОДОСВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МЯСНОГО СЫРЬЯ 73
Лабораторная работа № 1 Определение влагосвязывающей способности (ВСС) 78
Лабораторная работа № 2 Определение влагоудерживающей (ВУС), жироудерживающей (ЖУС), эмульгирующей (ЭС) способности, стабильности (СЭ) фаршевой эмульсии 82
Лабораторная работа № 3 Определение гелеобразующей способности (ГС) 89
ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ МЯСА ПРИ ХОЛОДИЛЬНОЙ ОБРАБОТКЕ 98
Лабораторная работа № 1 Определение перевариваемости мяса и мясных продуктов 108

Лабораторная работа № 2 Определение качественных показателей животных жиров 112
Лабораторная работа № 3 Определение биологической ценности животных жиров 121
ГЛАВА 5. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ МЯСОПРОДУКТОВ 131
Лабораторная работа № 1 Определение фенолов в копченых мясных продуктах 136
Лабораторная работа № 2 Определение бензапирена в копченых мясных продуктах 141
Лабораторная работа № 3 Определение нитратов и нитритов 145
Лабораторная работа № 2 Определение степени кулинарной готовности мясных продуктов 156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 159
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 160

ВВЕДЕНИЕ

Результаты научных биохимических исследований находят применение во всех структурах пищевой промышленности, сельского хозяйства и медицины, приобретают большое практическое значение.

В процессе переработки животного сырья на всех ее этапах в большинстве случаев происходят биохимические и связанные с ними физико-химические превращения различных компонентов исходного сырья. Разработка и совершенствование технологических процессов, обоснование эффективности режимов обработки мясного сырья, должны производиться с учетом этих превращений. Мясо, используемое для приготовления пищи непосредственно после убоя, не отличается высокими вкусовыми питательными свойствами. Нежную консистенцию и сочность, приятный вкус и аромат оно приобретает в результате созревания. Проведение биохимических исследований способствует установлению оптимальных условий для этого процесса.

Изменение химического состава сырья в процессе технологической обработки существенно влияет на качество готовой продукции.

Например, пищевая ценность того или иного продукта в значительной степени зависит от наличия в нем витаминов.

При производстве высококачественной мясной продукции необходимо знать строение витаминов и их свойства, учитывать содержание полезных веществ для человека в различных видах сырья, и предусматривать изменения при различных воздействиях (температуры, света, кислорода и т. д.).

При создании нового оборудования следует учитывать биохимические и физико-химические процессы, происходящие при получении мясных продуктов. Оборудование не только должно отличаться соответствующим уровнем производительностью, но и обеспечивать получение продукции высокого качества. Например, при производстве топленых жиров взаимодействие с кислородом воз-

духа и увеличение продолжительности нагрева приводят к получению готового продукта, непредназначенного для дальнейшего хранения.

С целью максимального сохранения питательных и вкусовых свойств, при разработке условий хранения мяса и мясопродуктов, необходимо учитывать химический состав продуктов и факторы, влияющие на развитие биохимических превращений сырья в процессе замораживания, посола и др.

Технологическая химия и физика мяса и мясных продуктов занимает центральное место среди методов повышения их качества мясопродуктов и способов увеличения их сроков хранения.

Не претендуя на исчерпывающую и полную оригинальность материала, авторы надеются, что данный лабораторный практикум поможет повысить уровень обучения, обеспечит необходимыми теоретическими и практическими знаниями в соответствии с современными требованиями.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

Студенты могут быть допущены к работе в лаборатории после того, как пройдут первичный инструктаж установленной формы.

При выполнении анализов все, находящиеся в лаборатории, должны быть одеты в халаты. В процессе работы не допускается захламленности рабочего места. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом, пробовать на вкус реактивы, пить из химической посуды, оставлять какое – либо вещество в посуде без соответствующей надписи. При включении электроприборов необходимо сначала получить инструктаж у преподавателя или лаборанта. Используемая в лаборатории стеклянная посуда – стаканы, колбы – не должны иметь сколов и трещин. При перемешивании стеклянной палочкой нужно избегать ударов по стенкам сосуда, что может привести к трещинам. Нельзя нагревать химическую посуду без асбестовой сетки.

Работать с концентрированными веществами следует в защитных очках, резиновых фартуках и перчатках, чтобы избежать ожогов при попадании на кожу. При работе с концентрированной серной кислотой ее необходимо вливать по стеклянной палочке в воду, а не наоборот.

Разлитые щелочи и кислоты необходимо нейтрализовать немедленно, а затем тщательно смыть водой. Точные дозы концентрированных кислот, щелочей и других агрессивных жидкостей отмеривают пипеткой с резиновой грушей или пипеткой с предохранительным шариком. Для нейтрализации щелочей применяют растворы борной или 8%-ной уксусной кислот, для нейтрализации кислот – 5%-ный раствор питьевой соды.

ГЛАВА 1. СОСТАВ, СВОЙСТВА И СТРУКТУРА МЯСА

Расширение ассортимента мясных продуктов на потребительском рынке России, включающих нетрадиционные и, зачастую, непредусмотренные технологическими документами компоненты, настоятельно требует изучения и широкого внедрения гистологического метода идентификации реального состава изделий. Возросшие за последние годы технические возможности гистологии позволяют проводить подобные исследования на достаточно высоком уровне.

Существующие методы гистологического анализа и идентификации состава мясопродуктов в настоящее время широко не используются, вместе с тем, их использование при исследовании качества мясопродуктов, идентификации состава мясопродуктов обоснованно и не преследует целью ограничить использование в мясной промышленности различных пищевых добавок, которые приводят к удешевлению продукции, более полному использованию мясного и растительного сырья, придания продукции новых качественных, в том числе и лечебных, свойств. Вместе с тем, фальсификация продуктов и несоответствие заявленному составу должна быть исключена, а потребитель мясопродуктов должен иметь полную информацию, что возможно на современном этапе только в случае широкого привлечения к сертификации продуктов метода качественного и количественного гистологического анализа.

Предложенные в данном методическом указании методы гистологического анализа составляют небольшую, наиболее часто используемую в практической деятельности, часть методов выявления различных компонентов пищевых продуктов, преимущественно произведенных на основе мясного сырья. Эти методы могут послужить основой для внедрения гистологического метода оценки качества продуктов и в другие области пищевой промышленности, что, несомненно, расширит полноту и достоверность проводимого контроля при сертификации продуктов, и позволит внедрить в практику мясоперерабатывающих предприятий, органов и центров сертификации перспективный, объективный и информативный метод гистологического анализа качества и состава мясопродуктов.

Для гистологического исследования необходимо изготовить гистологический препарат. В большинстве ситуаций способы его приготовления аналогичны таковым в общепринятой гистологии, однако в некоторых случаях образец требует специальной обработки. В целом приготовление гистологических препаратов включает в себя следующие этапы: отбор пробы, фиксация, подготовка к резке тонких препаратов, микротомирование, окраска и заключение препаратов.

Отбор и подготовка проб

В том случае, когда объект для исследования однороден (сосиски, бесструктурная колбаса) и имеет достаточную плотность, из него вырезают кубик или пластинку толщиной 1–1,5 см. Если объект рыхлый (фарш, паштет, колбаса или консервы), то отобранное количество материала или его кусочек завертывают в марлю. При этом толщина пробы не должна быть значительной, чтобы диффузия фиксирующих веществ не была затруднена. Одновременно от одного типа продукта отбирают несколько проб: либо из разных мест одного образца – в случае его большой величины, либо для дальнейшего исследования берут пробы от нескольких образцов – например, сосисок.

К каждому образцу мясопродукта иголкой с ниткой прикрепляют этикетки из ватмана или фотобумаги, на которых простым карандашом указывают дату взятия пробы и ее номер. Взятые для исследования образцы сопровождают документом, содержащим следующую информацию: номер и дата взятия образца, номер партии, вид мясопродукта, место взятия образца, состав по этикетке или сопроводительному сертификату, цель исследования, фамилия отбиравшего образцы, наименование лаборатории. В исследующей лаборатории эти данные, как и результаты исследования, заносятся в соответствующий журнал.

Фиксация

Одним из наиболее важных этапов подготовки гистологических препаратов является фиксация материала. Она имеет своей целью закрепить тканевые и клеточные структуры образца в том состоянии, в котором они находятся в момент отбора проб. Существуют

самые различные методы фиксации материала, описанные в гистологической литературе. Тот или иной из них выбирает для использования сам исследователь в зависимости от стоящей перед ним задачи. Однако неправильно выбранный способ фиксации материала может привести к появлению в ходе обработки значительных артефактов и не позволит произвести достоверную оценку структурных особенностей объекта. Поэтому при работе с фиксирующими жидкостями следует соблюдать ряд общих правил:

Объем фиксирующей жидкости должен превышать объем фиксируемого материала не менее чем в 20 раз,

Если фиксирующая жидкость после погружения кусочков мутнеет, то ее необходимо сразу же заменить,

Однажды использованную фиксирующую жидкость никогда не употребляют повторно и утилизируют.

Температурные режимы фиксации могут быть различными. Обычно ее проводят при комнатной температуре (18…20 °С). Более высокая температура ускоряет процесс фиксации, но также появляется возможность термической деформации или других артефактов.

Вследствие этого фиксированный при повышенных температурах материал не может быть проанализирован количественными методами. В отдельных случаях фиксацию проводят при пониженных температурах, вплоть до отрицательных. Подобный режим фиксации используют при повышенных требованиях к качеству сохранности анализируемого материала или работе с замороженной тканью и необходимостью выяснения, например, размеров и формы кристаллов воды в замороженном мясе.

Применение различных фиксирующих смесей позволяет в лучшей степени сохранять различные клеточные или тканевые компоненты. При этом использование смесей различных фиксирующих реагентов позволяет получать оптимальные результаты. Из большого числа предложенных в разное время фиксирующих средств практическое применение имеют мюллеровская жидкость, жидкости Орта, Карнуа, Буэна, смесь спирта с формалином. Но все они имеют свои недостатки. В зависимости от задачи исследования и типа конкретного материала подбирают методы фиксации.

Наиболее распространенная фиксирующая жидкость – ***формалин.*** Материал после фиксации формалином позволяет выявлять

большинство тканевых и клеточных структур, а также многие химические компоненты биологического происхождения – липиды, крахмал и т. д. Объекты после фиксации в формалине могут в последующем как подвергаться резке в замораживающих микротомах, так и пропитываться различными уплотняющими образец веществами. Обычный продажный формалин представляет собой 35–40 % водный раствор формальдегида. Для фиксации препаратов чаще всего используют 10 %, для чего исходный раствор разводят водой в 4 раза. Продолжительность фиксации в формалине составляет от 24 ч и более, но оптимальное время составляет 24–48 ч. В фиксирующей жидкости материал может храниться в течение очень длительного времени, однако перефиксированный материал плохо воспринимает дифференцирующие гистологические красители.

Для более мягкой фиксации и для фиксации при отрицательных температурах используется ***этиловый спирт,*** как абсолютный, так и 96 %. Фиксация спиртом проходит медленнее, чем формалином. Поэтому проводить ее предпочтительнее при пониженных температурах и в течение нескольких дней. Чаще всего его используют в смесях с формалином, пикриновой кислотой или другими реагентами. Также вследствие более медленной диффузии спирта в биологических тканях для полной и равномерной фиксации в нем используют более тонкие кусочки мясного сырья или продукта. Одним из наиболее простых критериев завершения фиксации материала служит равномерное его уплотнение и одинаковый вид, как на поверхности, так и на разрезе.

При работе с замороженными срезами может быть целесообразно исключение фиксации образца до получения монтированных на предметное стекло срезов. В этом случае имеет смысл проводить фиксацию на предметном стекле в течение 20–30 мин при комнатной температуре.

Сыпучие материалы (порошки) предварительно смешивают с мясным фаршем, в составе которого и проводят анализ состава порошка.

Промывка объекта

После завершения фиксации объект промывают в холодной

проточной воде. После этого из него вырезают кусочки для последующего изготовления гистологических препаратов. При резке колбас, ветчины или мясных консервов, прежде всего, производит отбор участков с измельченным фаршем и участков, имеющих какие-либо внешние отличия от общей массы продукта. Плотные и не рассыпающиеся объекты могут быть сразу же подвергнуты резке на замораживающем микротоме, рыхлые должны быть предварительно пропитаны уплотняющими средами.

Заливка объекта

В соответствии с разработанной во ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова модификации подготовки мясных продуктов для микроструктурных и химических исследований мяса чаще всего используют замораживающий микротом и при этом объекты либо сразу же после фиксации подвергают резке, либо предварительно заливают их в желатину. В случае прямой резки в замораживающем микротоме роль уплотняющей среды выполняет замороженная вода. Несмотря на все достоинства ***замораживающего метода*** (скорость и простота), он все же не может полностью заменить другие способы обработки тканей. Объекты, залитые в специальную более плотную среду (желатина, целлоидин, парафин), дают возможность получить значительно более тонкие срезы. При проведении исследования реального состава многокомпонентного мясного продукта, такого как колбаса, ветчина, консервы, фарши – это может иметь решающее значение для получения достоверного окончательного результата. В ряде случаев малая толщина анализируемого гистологического препарата очень существенна при проведении количественного морфометрического анализа. Помимо уплотнения препаратов желатином часто используют более сложные методы заливки в целлоидин или в парафин.

Метод заливки объектов в ***желатин*** имеет ряд преимуществ. Прежде всего, это его скорость, простота и доступность. Также при заливке материала в желатину очень незначительно деформируются и сжимаются пространства между частицами компонентов продукта и межклеточное вещество. При заливке в желатину также нет необходимости обезжиривать объекты, что позволяет исследовать структурные особенности жировой ткани и других липидсодержащих структур. Залитые таким образом объекты вполне можно резать на

замораживающем микротоме. При правильной технике без особых сложностей удается получать срезы толщиной 7–10 мкм даже из достаточно рыхлых объектов. Используя модификацию метода по Герингу – Тен Бергу после монтирования срезов на предметное стекло можно удалить желатин и тем самым избежать основного недостатка заливки в эту среду, вызываемого ее окрашиванием наиболее часто используемыми гистологическими красителями, такими как гематоксилин и эозин. Методы заливки в желатин можно разделить по технике и области применения на две совершенно различные группы. Первый метод, предложенный Апати, требует обезвоживания в спиртовой батарее до абсолютного спирта и нагрева до 60 °С, что неприемлемо при необходимости анализировать жировые и липоидные структуры. Однако при этом методе сохраняются в совершенно неизменном виде основное бесструктурное межуточное вещество тканей. Кроме того, для широкого употребления метод несколько сложен. Представителем другой группы методов заключения в желатин является метод Гаскелла-Греффа. При использовании этого метода не применяется ни нагревание объекта выше температуры тела – 38 °С, ни воздействие обезжиривающих веществ типа этилового спирта.

Состоит этот метод в следующем. Заключение в желатин проходит в два этапа. Сначала кусочек пропитывают в более жидком 12,5 % растворе, затем переносят в более густой 25 % раствор. Для приготовления последнего 25 г желатина растворяют на водяной бане при 37 °С в 75 мл карболовой воды в закупоренном сосуде. Чтобы избежать выпаривания. Более жидкий раствор получают, разбавляя 1 часть густого раствора 1 частью карболовой воды. Приготовленные таким образом растворы хранят в холодильнике. Каждый из приготовленных растворов используют только однократно, так как желатин при повторном расплавлении вследствие коагуляции белка хуже застывает.

Заливка объектов может начинаться только их после полного отмывания от фиксирующей жидкости в проточной воде. Отмытые кусочки на 6–24 ч помещают в жидкий и, по меньшей мере, на такой же срок в густой раствор желатина. Если промывка недостаточная, происходит фиксация белка желатины и нормального пропитывания кусочков не наблюдается. Осуществляется эта операция при 37 °С. Затем кусочки помещают в свежий густой раствор желатина в

чашки и как можно быстро охлаждают, например, в холодильнике. После остывания, примерно через 30 мин, вырезают полученные блоки, подсушивают на воздухе при комнатной температуре и дофиксируют (уплотняют) в течение 1–2 дней в растворе формалина с концентрацией 10 %. Для более длительного хранения используют 4 % раствор формалина. При плохом уплотнении блока он получается либо скользким, либо ломким. Для резки в микротоме блок сначала необходимо промыть в холодной проточной воде в течение 15 мин. Правильно приготовленный блок позволяет изготавливать срезы менее 10 мкм толщиной.

Резка объекта

Срезы объектов для гистологического исследования получают на специальных приборах – микротомах. Передвигая объект на заданное в мкм расстояние можно получать тонкие срезы заданной толщины. Микротомы бывают санные, ротационные и замораживающие. При работе с пищевыми продуктами чаще всего используют замораживающие микротомы. Для приготовления среза изучаемый объект помещают на охлажденный металлический столик, замораживают и производят резку, в ходе которой изготавливаются тонкие срезы. Следует отметить, что замораживающий микротом не позволяет изготавливать такие же тонкие срезы, как на санном или ротационном микротоме при резке блоков, залитых в целлоидин или парафин.

В случае анализа мелких изделий, таких как, например, сосиски, срезы удобней всего делать вдоль, чтобы получить максимальную плоскость.

Получаемые в криомикротоме срезы собирают в чашки Петри в воду. В случае дополнительно фиксированных после заливки в желатин блоков получаемые срезы могут храниться в слабом формалиновом растворе (2–4 %) достаточно долго. Также срезы могут собираться на охлажденное предметно стекло, расправляться кисточкой и фиксироваться на стекле подогреванием его пальцем при последующем замораживании и подсушивании в криомикротоме. В случае использования заливки в желатину по методу Геринга и Тен Берга предметные стекла для монтирования срезов предварительно покрывают тонким слоем 3 % желатины. Удаляют из срезов остатки желатины, помещая стекла на 10 мин в термостат при 37 °С.

Окраска срезов

Срезы для гистологического исследования желательно окрашивать сразу же после их изготовления. Однако срезы, полученные с объектов, подвергшихся заливке в уплотняющую среду, могут некоторое время храниться либо в холодильнике (желатиновая заливка), либо при комнатной температуре – целлоидиновая и парафиновая заливка. Срезы, полученные на замораживающем микротоме и целлоидиновые срезы, почти всегда окрашивают до монтирования на предметные стекла, парафиновые – всегда после их монтирования.

При проведении окрашивания гистологических срезов следует придерживаться следующих основных правил: растворы красок готовить своевременно в химически чистой посуде и на дистиллированной воде, перед работой используемые красители следует профильтровать, окрашивание и дифференцировку необходимо вести под контролем микроскопа, все манипуляции со срезами осуществлять чистыми препаровальными иглами или стеклянными палочками. Окрашивание срезов удобнее проводить в бюксах емкостью 20–30 мл. Окрашивание уже монтированных срезов осуществляют в специальных стаканчиках.

Благодаря тому, что определенные составные части клеток и тканей воспринимают и удерживают красители с большей интенсивностью, чем другие, удается выявить и отличить друг от друга различные структурные компоненты, недостаточно дифференцируемые в неокрашенном состоянии. Сам же процесс окраски состоит в обработке среза в той или иной последовательности различными реагентами – красителями, позволяя окрасить различные компоненты объекта в максимально контрастные цвета.

Все употребляемые в гистологии красители в зависимости от их химических свойств и сродству к тем или иным тканевым элементам делятся на несколько групп. Основные красители (ядерные) – например гематоксилин; кислые красители (диффузные, протоплазматические) – эозин и фуксин; нейтральные красители – метиленовый синий; специальные красители – судан и др.

В зависимости от количества применяемых красящих средств в гистологической технике различают следующие типы окраски: простую – когда используется один краситель и комбинированную. При большинстве этих окрасок главная роль принадлежит основному

красителю, который употребляется либо самостоятельно, либо в сочетании с кислыми (одним или несколькими). Наиболее распространены сложные комбинированные окраски.

Различают общие окраски, позволяющие составить представление об архитектонике объекта и обо всех или большинстве компонентов, входящих в его состав. А также избирательные окраски, выявляющие и дифференцирующие ту или иную определенную структурную часть анализируемого среза – жир, крахмал, соединительнотканные волокна или другие тканевые, или же клеточные компоненты. Наиболее часто и практически всегда – на первом этапе исследования используется общая окраска. На практике обычно применяют в таком случае окраску гематоксилином и эозином.

Сущность окраски ***гематоксилином и эозином*** состоит в следующем. Срезы окрашивают в гематоксилине в течение 3–5 мин, затем дифференцируют в 1 % растворе соляной кислоты, промывают водопроводной водой. При этом красный цвет среза изменяется на синий. Докрашивают срезы в 1 % в растворе эозина примерно 1 мин. После интенсивного промывания в воде срезы обезвоживают в спиртовой батарее, просветляют в карбол-ксилоле и монтируют на предметные стекла. Клеточные ядра этим красителем окрашиваются в синий цвет, цитоплазма – в красновато-розовый.

Другим распространенным методом общей гистологической окраски является ***метод Ван-Гизона*** с использованием железного гематоксилина Вейгерта (Эрлиха) и пикрофуксина. При этом методе сначала срезы окрашивают в течение 5 мин в железном гематоксилине Вейгерта (Эрлиха) и промывают в воде. На втором этапе срезы докрашивают в пикрофуксине около 5 мин и очень быстро (1–2 с) смывают избыток красителя дистиллированной водой. Дальше после обезвоживания срезы заключают в специальные среды. В результате клеточные ядра окрашиваются в черный цвет, коллагеновые волокна – в красный, гладкая и поперечнополосатая мышечная ткань приобретает светло-желтый цвет. Для получения хороших результатов окраски по методу Ван-Гизона надо использовать максимально тонкие срезы и материал заливать в более плотные, чем желатина среды. Помимо двух приведенных методов общей окраски известно и применяется достаточно много других (таблица 1).

Таблица 1 – Окраска тканей и соединительнотканных волокон различными красителями

Ткань	Окраска по Ван-Гизон	Окраска гематок-силин-эозин	Окраска кармин-фуксин	Окраска резорцин-фуксин	Окраска Судан 3
Мышечные волокна	Желтая	Красная	Оранжевая	–	–
Эпителиальная ткань	Желто-розовая	Розовая	Розовая	–	–
Коллаген	Красная	Красная	Синяя	–	–
Эластин	–	Красная	Красная	Темно-синяя	–
Жир	–	–	–	–	Оранжевая

Помимо методов общей окраски существует множество методов специальных окрасок, позволяющих выявлять как отдельные тканевые и клеточные структуры, так и различные химические вещества. Эти методы относятся к классу гистохимических. Часть из них весьма трудоемка и не всегда позволяет получать достоверные результаты и вследствие чего в практической работе с пищевыми мясными продуктами используется редко. Другая их часть применяется систематически и позволяет устойчиво получать достоверные качественные и количественные результаты.

Иногда возникает необходимость в выявлении жиров и жироподобных веществ. Для их обнаружения необходимо использовать срезы, не подвергавшиеся обезвоживанию или обезжириванию. С этих позиций лучше всего подходят замороженные срезы после формалиновой фиксации. Известны самые различные способы окрашивания этих веществ: окраска Суданом III и IV, Суданом черным «В», осмиевой кислотой и т. д. Чаще всего применяют окраску растворами Судана. Для этого криостатный срез ополаскивают в 50–70 % спирте в течение 1 мин и помещают в 0,3 % раствор Судана на 70 % спирте. Окраску проводят 5–25 мин, после чего срезы опять споласкивают в 50–70 % спирте. Споласкивание до и после окраски в спиртовом растворе имеет целью предупредить выпадение осадка красителя в срезах вне связи с жировыми компонентами. После выявления жира при необходимости срезы докрашивают в одном из основных красителей, например, гематоксилине. Следует отметить,

что срезы, окрашенные Суданом, не допускают обычного обезвоживания, просветления и заключения в бальзам. Вследствие этого следует использовать заключение в глицерин-желатин.

Также часто возникает потребность в оценке содержания в анализируемом продукте соединительнотканных компонентов. Наличие и состав соединительнотканных элементов можно оценить и на препаратах, окрашенных общими гистологическими красителями, но не всегда достаточно полно. Наиболее удобен из общих окрасок для этой цели метод Ван-Гизона. Для выявления коллагеновых волокон можно также рекомендовать применение окраски по методу Маллори в модификации Гейденгайна. По этому методу срезы окрашивают в азокармине в течение 10–30 мин и более. Затем срезы в течение 30 с обрабатывают 1% уксусным спиртом и далее на несколько мин переносят в 5 % водный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты. После споласкивания в дистиллированной воде срезы докрашивают в смеси анилинового синего с оранжем от 1 до 3 ч. В результате такой окраски коллагеновые волокна приобретают синий цвет, мышечная ткань становится оранжевой, а ядра клеток и эритроциты – красными.

Для выявления эластических волокон наиболее применим метод окраски резорцин фуксином. Это способ окрашивания чаще всего комбинируют с каким-либо основным красителем, обычно с литиевым кармином Орта. Окрашивать для выявления эластических волокон можно как замороженные срезы, так и целлоидиновые и другие. При этом срезы окрашивают в литиевом кармине в течение 10–15 мин и без споласкивания в воде переносят в 1 % соляно кислый спирт (70 %) на 5–15 мин и более. Данная процедура позволяет одновременно фиксировать срез и проводить его дифференцировку. На следующем этапе срезы споласкивают 70–80 % спирте. После этого срезы помещают в свежий профильтрованный раствор фуксина на 20–30 мин. Затем 1–2 мин промывают в 70–80 % спирте. На завершающем этапе срезы дифференцируют в 1 % соляно кислом или чистом 96 % спирте в зависимости от степени перекрашивания препарата. Соляно кислый спирт показан при сильном перекрашивании, а при небольшом закрашивании достаточно и одного 96 % спирта. Дифференцировку ведут обязательно под контролем микроскопа до тех пор, пока отчетливо не проступят эластические во-

локна. Для этого обычно требуется 1–3 мин. Результат окрашивания: ядра клеток – красные, эластические волокна – темно синие.

Помимо компонентов животных тканей в мясопродуктах часто используются растительные компоненты. Белковые растительные добавки выявляются теми же красителями, что и животные. Растительные клеточные элементы (например, лук или пряности) также окрашиваются уже упомянутыми методами окраски. Такие же компоненты как крахмал и целлюлоза лучше окрашивать специально.

Окраску крахмала наиболее удобно проводить люголевским раствором. Это раствор приготавливают следующим образом: 1 г йода и 2 г йодистого калия растирают и растворяют в специальной посуде в небольшом (до 10 мл) количестве воды, затем объем раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой. Срезы окрашивают после помещения на предметное стекло, перенося на него по капле раствор Люголя. Можно использовать также аптечный раствор йода, который лучше разводить водой до цвета чая. Исследование проводят сразу же после окрашивания без заключения под покровное стекло, так как происходит быстрое обесцвечивание зерен крахмала. Зерна крахмала при этом окрашиваются в черно-синий цвет, остальные ткани – в желтый цвет. Если препарат с окраской йодом сохраняется в сухом виде, то крахмал остается видимым до нескольких лет и возможно повторное его окрашивание, и дифференцировка.

В случае специальных задач используют один из методов окрашивания препаратов, приводимых в гистологической литературе. Возможно также использование гистохимических и иммунохимических методов, однако они требуют более высокой квалификации оператора и, зачастую, дополнительного специального оборудования.

Заключение готовых препаратов

Для заключения окрашенных срезов под покровное стекло применяют несколько различных сред. Выбор той или иной среды зависит от нескольких факторов. Первое – насколько долго предполагается хранить изготовленные препараты. Второе – выдерживает ли использовавшаяся окраска обезвоживания препаратов. Препараты для длительного хранения заключают в канадский бальзам, поли-

стирол или другие среды. Для препаратов, требующих при заключении и хранении водной среды, применяют глицерин-желатин.

При использовании для заключения препаратов таких сред как канадский (пихтовый) бальзам и полистирол срезы обязательно обезвоживают в восходящем спиртовом ряду и проводят через бензол-спирт (ксилол-спирт) до бензола (ксилола) для обезвоживания. Если обезвоживание недостаточно полное под покровным стеклом со временем будут формироваться затрудняющие его просмотр артефакты. После обезвоживания помещенного на стекло среза на его поверхность с края наносят каплю бальзама или раствора полистирола и осторожно покрывают покровным стеклом. Под покровным стеклом не должны образовываться воздушные пузырьки. Жидкий канадский бальзам продается в готовом виде. Раствор полистирола приготавливают заранее из расчета 30 г полистирола, 6 мл дибутилсебацината и ксилол или толуол до 100 мл.

Если используемая окраска исключает возможность обезвоживания срезов их заключают в глицерин-желатин. Приготавливают ее следующим образом. Порошковый желатин в количестве 7 г помещают в 42 мл дистиллированной воды для набухания и затем растворяют при легком подогреве на водяной бане. После растворения добавляют 50 г глицерина и 1 г карболовой кислоты. Нагревают смесь на водяной бане при постоянном помешивании до получения однородного раствора, который фильтруют в горячем состоянии. При заключении глицерин-желатин осторожно разогревают до плавления и каплю наносят на препарат аналогично тому, как это описано для бальзама. Если после нанесения покровного стекла под ним остался избыток заключающей среды, ее можно осторожно удалить, нагревая препарат и легко прижимая покровное стекло к предметному.

В отдельных случаях используют заливку материала в ***целлоидин.*** Для этого материал после фиксации и промывки подвергают обезвоживанию в спиртах восходящей крепости – 70°, 96°, абсолютный. Кусочки после обезвоживания, с целью лучшего обезжиривания, обрабатывают в смеси спирта с эфиром 1 : 1 в течение 24 ч. Затем их перекладывают в жидкий раствор целлоидина на 2–4 дня и на 1–2 дня в густой целлоидин. Целлоидиновые блоки наклеивают на колодки и хранят в 70° спирте. Изготовление срезов для исследо-

вания осуществляют на санном микротоме. Готовят целлоидин следующим образом. Коллодийную нитроцеллюлозу нарезают на мелкие кусочки и высушивают. Из нее приготавливают два раствора на смеси 1 : 1 абсолютного спирта с эфиром. Один более жидкий – 4–5 %, другой более густой – 8–10 %. Вначале готовят более густой целлоидин. Для получения более жидкого его разбавляют пополам смесью спирта с эфиром. Приготовление раствора целлоидина занимает несколько дней.

Приготовление красителей

Для того чтобы приготовить ***гематоксилин Эрлиха*** берут 10 % спиртовой раствор гематоксилина на 96° спирте – 20 мл, 80 мл 96° спирта 100 мл глицерина, 100 мл дистиллированной воды, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 3 г алюмокалиевых квасцов. Полученный раствор наливают в банку с широкой горловиной, завязывают марлей и в таком виде оставляют стоять на свету для созревания. Краска созревает в течение нескольких недель или месяцев. Созревший раствор фильтруют и хранят в плотно закрытой посуде (цвет раствора – темно вишневый). Также можно использовать другие виды гематоксилина, в том числе готовые.

Используется также ***эозин*** в 0,25–1,0 % водных и спиртовых растворах. Для приготовления спиртовых растворов можно пользоваться любыми сортами эозина и брать спирт различной крепости – от 40 % до 70 %. Эти растворы окрашивают интенсивнее водных. Растворы эозина розового цвета. В такой же цвет окрашиваются и ткани.

Раствор ***Судана Ш*** приготавливают следующим образом. Берут 0,3 г сухой краски на 100 мл 70 % спирта и кипятят на водяной бане со всей предосторожностью. Затем охлаждают, фильтруют и хранят в закрытой склянке. Рекомендуется выдержать раствор в течение нескольких дней в термостате при 37 °С.

Для того чтобы приготовить ***резорцин-фуксин*** необходимо в 200 мл дистиллированной воды растворить 2 г основного фуксина и 4 г резорцина. Жидкость нагревают до кипения и добавляют 25 мл оффицинального раствора полутора хлористого железа. Раствор кипятят при помешивании еще 5 мин, охлаждают и фильтруют. Фильтрат выбрасывают. Фильтр высушивают и переносят в 200 мл 96°

спирта, осторожно нагревают до кипения. Не растворившийся остаток краски соскабливают с фильтра в спирт, а фильтр выбрасывают. Раствор краски охлаждают, доливают спиртом до 200 мл, после чего добавляют 4 мл крепкой соляной кислоты (плотность 1,16–1,19). Краска должна созревать в течение 1,5–3 месяцев.

Для приготовления раствора ***азокармина*** берут азокармина B 0,5–1 г или G – 0,1 г на 100 мл дистиллированной воды и нагревают до кипения, затем охлаждают и фильтруют через рыхлый фильтр. На 100 мл профильтрованного раствора добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты.

Пикрофуксин готовят из насыщенного при комнатной температуре водного раствора пикриновой кислоты и 1 % водного раствора кислого фуксина. Для этого смешивают 10 мл пикриновой кислоты и 1 мл фуксина. Краска требует очень тщательного приготовления, иногда приходится подгонять соотношение ее компонентов по контрольным препаратам.

Смесь ***анилинового синего*** (водорастворимый препарат) и ***оранжа G*** готовят из 0,5 г первого, 2 г второго, 100 мл дистиллированной воды и 8 мл ледяной уксусной кислоты. Полученную смесь кипятят, охлаждают и фильтруют. Для окрашивания используют краску, разведенную в 2–3 раза дистиллированной водой. Такой красящий раствор хорошо сохраняется.

Контрольные вопросы

1. Для чего используются методы гистологического анализа?
2. Как производится отбор и подготовка проб?
3. Перечислите способы фиксации образцов.
4. Как и при помощи каких красителей производится окраска срезов?
5. Как готовятся красители?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1
ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МЯСНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Цель занятия: Ознакомление с методикой приготовления гистологических препаратов из мясных изделий, аппаратурой, реактивами, материалами. В задачи работы входит изучение гистопрепаратов мясных изделий. Изучение методики приготовления гистологического материала, методических указаний, мультимедийный просмотр. Просмотр гистопрепаратов мышечной ткани, субпродуктов различных животных, мясных изделий.

Порядок выполнения работы. Отбор проб

Перед отбором проб для гистологического изучения каждый продукт следует оценить визуально. Для этого на свежем срезе продукта определяют его окраску, консистенцию, степень измельчения компонентов и равномерность их распределения в массе фарша. Отмечают размеры крупных частиц, особенно частиц сухожилий, хряща и костей, кровеносных сосудов и нервов. Заключение об общей структуре продукта можно сделать только на основании оценки нескольких срезов.

После проведения макроскопической оценки образца производят отбор участков для дальнейшего гистологического исследования. В зависимости от структурных и физических характеристик продукта выбирают необходимую методику фиксации объекта, а в зависимости от поставленной задачи – этапы обработки материала, их очередность и способ окраски препаратов. Для ускорения проведения подготовки гистологического препарата целесообразно по возможности исключать этапы фиксации и уплотнения образцов. У объектов с равномерным распределением составных частей для дальнейшего исследования отбирают образец с любого места и, если это возможно, захватывая зону под оболочкой и саму оболочку продукта. У объекта, состоящего из различающихся при визуальном осмотре компонентов, отбирают наиболее измельченные участки и участки, различающиеся по внешнему виду. Далее по одному из описанных ранее методов изготавливаются гистологические препараты, и проводится их микроскопическое изучение, либо изучаются готовые гистопрепараты.

Для выявления крахмала и крахмалсодержащих компонентов изготавливают отдельные срезы. Эти среза после анализа крахмала можно повторно по общей схеме окрасить гематоксилином и эозином. Окраску жира Суданом в общем случае проводить не обязательно, так как жир и так хорошо дифференцируется и без специального окрашивания гистологических препаратов. При анализе печени наоборот следует ограничиваться только окраской Суданом, лучше черным, для выявления жирового перерождения паренхиматозных клеток.

Изучение препаратов

Приготовленные, либо готовые гистологические препараты рассматривают под любым световым микроскопом. Сначала используют малые плановые увеличения объектива – 10×, 20×, а затем большие – 40× и 63×. Окуляры применяют с 10 – или 16-кратным увеличением. Для получения достоверных результатов необходимо не ограничиваться исследованием одного препарата или одного среза. Следует проанализировать не менее чем по два среза с каждого из 3 кусочков, отобранных от каждого образца. В случае необходимости получения количественных результатов число исследуемых препаратов определяется требованием статистической достоверности получаемых итоговых цифр.

Количественные исследования

Приготовленные либо готовые должным образом максимально тонкие препараты, окрашенные с достижением наибольшей контрастности анализируемых компонентов, исследуют под световым микроскопом. Могут быть использованы полуколичественные методы и следующая классификация по встречаемости компонента: «преимущественно», «в достаточном количестве», «в среднем количестве», «в умеренном количестве», «в незначительном количестве», «в отдельных случаях». Лучше же предоставлять более строгий математический результат. Для этого оптимально проводить исследования на одном из широко производимых в нашей стране и за рубежом компьютерных анализаторов изображения по прилагаемым производителем программам, адаптированным для гистологических исследований («Carl Zeiss», «Magiscan», «Leitz», «Opton».

Проведение измерений при помощи системы анализа изображения

При проведении измерений с помощью системы анализа изображения отечественного или зарубежного производства по специальным программам для морфологических исследований. Для частиц сложной формы измеряют максимальный диаметр Фере, для линейных частиц – их длину. При невозможности автоматического разделения частиц компонентов используют их интерактивное разделение. Получают следующие результаты: общее количество частиц, минимальные и максимальные размеры частиц, средние размеры частиц и их процентное соотношение, а также другие параметры в соответствии с программой системы анализа изображения. Статистические результаты получают автоматически в виде таблиц, графиков распределения размеров или диаграмм.

На основании полученных данных рассчитывают процент частиц, превышающих нормативный размер. Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m_2}, \quad (1)$$

где m_1 – определенное количество частиц сверхнормативного размера;

m_2 – общее количество измеренных частиц;

X – процентное содержание частиц сверхнормативного размера.

Для получения достоверных результатов необходимо исследовать не менее трех срезов с каждого из 3 кусочков, отобранных от каждого образца. За окончательный результат принимается среднее, полученное от трех параллельных измерений. Для сыпучих компонентов возможно проведения анализа нанося порошок непосредственно на предметное стекло. В каждой из параллельных измеряют не менее 100 частиц. При недостаточной точности получаемого результата количество измеряемых частиц необходимо увеличить или анализировать отдельно фракции крупных частиц и мелких частиц.

В общем случае обязательным параметром является количество и процент частиц, превышающих нормируемый размер. Или описы-

вается общая популяция анализируемых частиц в форме гистограммы распределения.

Пример определения цены деления окуляр-микрометра.

В 32 делениях объект-микрометра полностью укладывается 16 делений окуляр-микрометра; значение одного деления шкалы объект-микрометра известно и равно 0,01 мм или 10 мкм. По формуле находим цену деления шкалы окуляр-микрометра. Она будет равна:

$$\frac{32 \cdot 10\text{мкм}}{16} = 20 \text{ мкм}.$$

Зная цену одного деления окуляр-микрометра при заданном увеличении, можно приступить к измерению объектов. При этом соответствующее длине измеряемого объекта число делений окуляр-микрометра необходимо умножить на 20 мкм (найденную цену одного деления).

В зависимости от программного обеспечения и поставленной задачи эти исследования можно проводит в автоматическом или интерактивном режиме. Подобное морфометрическое исследование можно проводить и при отсутствии специального анализатора изображения, однако в этом случае такая работа требует больших трудозатрат при меньшей степени точности получаемых результатов. В простейшем случае использовать специальные решетки, вставляемые в окуляр. Процент попаданий пересечений этой решетки на тот или иной компонент будет соответствовать проценту содержания данного компонента в продукте. При проведении подобного анализа следует не забывать о требованиях достоверности в соответствии с правилами математической статистики.

Проведение измерений размеров частиц компонентов (дисперсности)

Определение дисперсности проводят с использованием такого увеличения объектива, чтобы в поле зрения находилось не менее 10, но не более 50 измеряемых частиц. Измерение проводят с помощью окуляр-микрометра или системы анализа изображения.

При проведении измерений дисперсности частиц компонентов анализируемого продукта следует придерживаться следующей последовательности: оценить скелетную мускулатуру, жировую ткань и элементы соединительной ткани. Измерение частиц растительных компонентов проводится на тех же срезах, что и для анализа животных компонентов.

Прежде чем приступить к работе с окуляр-микрометром необходимо определить цену его деления для каждого используемого в работе сочетания объективов и окуляров. Требуемая оптическая комбинация должна позволить достоверно идентифицировать анализируемый компонент и провести достаточное количество измерений частиц с одного поля зрения микроскопа (условно от 10 до 50).

Окулярный микрометр представляет собой круглую стеклянную пластинку, устанавливаемую в окуляр, в центре которой нанесена линейка длиной 5 мм. Линейка разделена на 50 частей по 0,1 мм каждая.

Перед измерением проводят определение цены деления шкалы окулярного микрометра. Для этого на предметный столик помещают объект-микрометр, и оценка проводится при каждом используемом сочетании окуляра и объектива. Объект микрометр проходящего света представляет собой предметное стекло с нанесенной линейкой длиной 1 мм, разделенной на 100 частей и покрытой покровным стеклом. Одно деление шкалы объект-микрометра соответствует 0,01 мм или 10 мкм. Шкалы объект-микрометра и окулярного микрометра устанавливают параллельно при этом совмещают их нулевые отметки. Затем определяют, сколько делений объект-микрометра точно совпадает с делениями окулярмикрометра.

Цену деления окуляр-микрометра *(m)* определяют по формуле:

$$m = \frac{a \cdot c}{\text{в}} \qquad (2)$$

где a – отсчитанное число делений по шкале объект-микрометра;

$в$ – соответствующее число делений шкалы окуляр-микрометра;

c – известное значение одного деления шкалы объект-микрометра, которое равно 10 мкм.

Для измерения при очень малых увеличениях применяют объект-микрометры, у которых 1 см разделен на 100 частей по 0,1 мм каждая. В этом случае одно деление шкалы объект-микрометра равно 100 мкм.

При проведении измерений вручную используют специальный окуляр-микрометр, или окулярный микрометр, помещаемый в окуляр микроскопа. Предварительно необходимо откалибровать линейку окуляра под используемые объективы по шкале микролинейки на предметном стекле. Измерение можно проводить с использованием любого объектива, но так, чтобы измеряемых структур в поле зрения было не меньше 10 и не больше 50. Измеряется максимальный диаметр окружности или эллипса, условно описываемых вокруг анализируемой структуры.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ГЛАВА 2. ИЗМЕНЕНИЯ МЯСНОГО СЫРЬЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Рациональное использование животного сырья основано на знании не только химического состава, но и особенностей протекания биохимических процессов в органах и тканях при жизни животного, после ее прекращения и при технологической обработке.

Прижизненные процессы управляемы и многообразны, протекают в строгом соответствии и взаимоувязаны. Большую роль в них играют биологически активные вещества – ферменты и гормоны. Многие ткани животных организмов синтезируют в той или иной мере эти вещества, обеспечивая жизнедеятельность организма. После убоя животных эти ткани служат источниками для получения биологически активных веществ и изымаются в процессе разделки туш. Например, поджелудочная железа, гипофиз, слизистые оболочки желудков и кишечника и др.

После смерти животного, с прекращением обмена веществ, основным биохимическим процессом при переработке сырья биологического происхождения является автолиз (от греч. autos – сам и lysis – растворение), основу которого составляют ферментативные процессы, при жизни связанные с функцией координированного движения. Автолизом называется процесс распада веществ и тканей под действием ферментов самих тканей. При жизни животного он возможен только в патологических случаях, например, при недостаточном снабжении какого-либо органа кровью.

В послеубойный период свойства всех тканей животного организма значительно изменяются, особенно существенны изменения мышечной ткани, в которой ферменты (протеазы, карбогидразы, эстеразы, ферменты гликолиза и другие) – катализируют реакции распада. Процесс становится необратимым, протекающим только в одном направлении. Особая роль в процессе автолиза принадлежит внутриклеточным протеазам – катепсинам.

При переработке убойных животных ткани можно разделить на две группы: к первой относятся те, в которых протеолиз происходит под действием внутриклеточных протаз типа катепсинов (мышеч-

ная ткань, печень, и др.); ко второй – ткани, в которых синтезируются внеклеточные протеазы типа пепсина, трипсина, химотрепсина, карбоксипептидазы, дипептидазы, аминопептидазы (слизистая желудков, поджелудочная железа и т. д.), а также гормоны. Для первой группы тканей весьма важен период автолиза, так как именно он определяет функционально-технологические свойства сырья.

Вторая группа представляет объекты для получения медицинских и технических препаратов, нашедших широкое применение в медицине и перерабатывающих отраслях АПК.

Механизм автолиза и автолитические превращения мышечной ткани

Эффективное и рациональное использование сырья предусматривает сохранение качества на всех этапах переработки, начиная от транспортировки животных на мясокомбинат и их убоя до хранения готовой продукции. Определяющим условием для формирования биохимических свойств мяса и качества продуктов является уровень и характер развития автолитических процессов в животных тканях. Изменения, происходящие в послеубойный период в мышечной ткани, имеют важное практическое значение, оказывают существенное влияние на пищевую ценность мяса и его потери в процессе технологической обработки.

Современные представления о механизме автолитических процессов базируются на ферментативной природе посмертных изменений мышечной ткани, установленных в 30-х гг. И. А. Смородинцевым. Наиболее важное значение здесь отводится двум основным ферментным системам. Одна из них, очевидно, связана с функцией движения и регулирует сокращение – расслабление, другая – катализирует непрерывный распад главных структурных элементов мышечного волокна по типу гидролиза. Роль каждой из этих двух систем в развитии этапов автолиза различна, но их функции тесно связаны между собой.

Начиная с момента убоя в мышечной ткани происходят непрерывные изменения под действием тканевых ферментов. В основе всех изменений, приводящих к развитию посмертного окоченения, его последующему разрешению и завершению созревания мяса с

приобретением им функциональных и технологических свойств, лежат ферментативные реакции.

В послеубойный период с развитием окоченения главную роль играют ферменты сокращения – расслабления, вызывающие изменения сократительного аппарата – миофибрилл, распад АТФ и других несущих в себе запас энергии веществ, а также обеспечивающие синтез АТФ за счет превращения углеводов, и прежде всего гликогена.

В сложных процессах автолитических превращений мышечной ткани важная роль принадлежит изменениям углеводной системы. Накопление продуктов их автолитического распада существенно влияет на физико-химические и биохимические изменения белков мышечной ткани.

В комплексе биохимических превращений, происходящих в начальный период автолиза мышц, наиболее отчетливо проявляются превращения гликогена и изменения органических фосфорных соединений.

Автолитические превращения гликогена связаны с его фосфоролитическим распадом и дальнейшим процессом анаэробного гликолиза, который приводит к необратимому накоплению молочной кислоты и снижению pH мышечной ткани. Кроме того, мышечный гликоген в процессе автолиза подвергается интенсивному гидролитическому амилолитическому распаду, ведущему к накоплению в мышечной ткани редуцирующих углеводов. Таким образом, автолитический распад мышечного гликогена обусловлен двумя параллельно протекающими процессами: анаэробным гликолизом с образованием молочной кислоты и гидролизом с образованием редуцирующих углеводов. Общие закономерности протекающих процессов, сопровождающиеся накоплением или распадом специфических биохимических веществ.

Таким образом, методы химического и биохимического анализа тканей весьма полезны в оценке глубины и характера автолитических превращений тканей мяса.

Состояние автолиза тканей легко определить по внешним признакам визуально. Сразу после убоя мышечная ткань расслаблена, поскольку в клетках содержится АТФ, уровень которой поддерживается в результате ряда хаотично протекающих реакций. Затем че-

рез несколько часов ранее расслабленные мышцы теряют свою гибкость, эластичность, становятся твердыми и непрозрачными. Наступает посмертное окоченение, которое сохраняется в течение 24–28 ч. По истечении 24–28 ч все более заметными становятся признаки разрушения клеточных структур: ядра сморщиваются, появляются поперечные разрывы мышечных волокон. Накопление специфических химических веществ в процессе автолиза служит основой органолептической оценки состояния сырья.

Можно выделить ряд объективных биохимических, физико-химических, морфологических признаков оценки этапов послеубойного созревания мяса.

Так, процесс созревания мяса связан с переходом части водорастворимых белков мышечных волокон в коагулированное состояние, причем особенно сильный сдвиг в соотношении общего аминного и аммиачного азота водной вытяжки мяса при 4 °С приходится на 6-й час после прекращения жизни животного. Массовая доля коагулирующих белков водной вытяжки составляет 60 % общего азота вытяжки.

Отношение миозина к миогену уменьшается почти в три раза к 24-му часу и остается затем постоянным. Отношение азота растворимого белка к белковому азоту к 24-му часу уменьшается в два раза – с 0,6 до 0,3 – и стабилизируется. Общее количество экстрактивных веществ держится на стабильном уровне в течение 10 сут. Массовая доля молочной кислоты составляет 0,7–0,8 %; редуцирующих сахаров – 0,2 %; pH 5,6–5,7 (данные для однотипных животных: коровы в возрасте 6–7 лет, средней упитанности).

Наиболее важной составной частью мяса по объему, питательной и биологической ценности является поперечнополосатая мышечная ткань туш убойных животных. В этой связи важно знать не только последовательность послеубойных изменений мышечной ткани, но и иметь достоверный метод их определения.

Важно отметить, что в процессе биохимических превращений белковых и азотистых экстрактивных веществ в мясе накапливаются химические предшественники вкуса и аромата мяса.

Интенсивный обмен белков в животных тканях требует наличия системы, осуществляющей интенсивный распад белковых веществ.

В связи с ведущим значением биохимических ферментативных процессов для направленного регулирования свойств мясного сырья и готовых продуктов большое практическое значение имеют тканевые ферментные системы мяса. Действие протеолитических ферментов в животных тканях в послеубойный период направлено на расщепление собственных компонентов и структур клеток.

Протеиназы, осуществляющие гидролиз белков, подразделяют на экзо- и эндопептидазы. Место приложения первых – концевые участки полипептидных цепей, вторых – внутренние участки цепи. Экзопептидазы содержатся как в саркоплазме и саркоплазматическом ретикулуме, так и в лизомах, тогда как внутриклеточные эндопептидазы находятся, как правило, в лизосомах клеток.

Прижизненная роль внутриклеточных протеолитических ферментов многогранна: они участвуют в катаболизме белков и доставке пластического материала для биосинтетических реакций, образовании и распаде физиологически активных веществ, оказывают прямое воздействие на энзиматический аппарат клетки посредством активации зимогенов или протеолитической модификации самих ферментов и т. д.

В автолитических превращениях мышечной ткани наиболее важное значение имеет деятельность двух основных ферментных систем. Одна из них связана с функцией движения, другая катализирует непрерывный распад главных структурных элементов мышечного волокна, в том числе актомиозинового комплекса. Главная роль здесь отводится катепсинам.

Катепсины – кислые протеиназы, проявляют максимальную активность при pH 2,0–5,0, широко представлены в органах и тканях и локализованы в лизосомах, которые представляют собой внутриклеточные пузырьки диаметром около 5,5 мкм, ограниченные мембраной.

Катепсины являются типичными протеиназами и вызывают деструкцию высокомолекулярных белков. С деятельностью катепсинов, которые во втором периоде автолиза освобождаются из лизосом и активируются кислой реакцией среды клетки, тесно связаны изменения свойств белков, предшествующие релаксации мышц.

В настоящее время в мышечной ткани идентифицирован ряд ферментов эндопептидазного действия – катепсины B1, D, H, L, G и экзопептидазы – катепсины A, B_2 и C.

Катепсин В1 является тиоловой эндопептидазой и активируется SH-соединениями, имеет оптимум активности при pH 6,0, проявляет более высокую, по сравнению с коллагеназой, способность к гидролизу коллагена в кислой среде и напоминает папаинтиоловую протеиназу растительного происхождения, широко используемую для мягчения мяса.

Катепсин D – карбоксильная эндопептидаза, проявляющая активность при pH 2,8–4,0, расщепляет низкомолекулярные пептиды, имеет сродство к пептидным связям, образованным гидрофобными боковыми радикалами, и поэтому сходен с пепсином – пищеварительным ферментом, выделяемым слизистой оболочкой желудка. Катепсин E отличается от катепсина D субстратной специфичностью, более кислым характером и лабильностью. Катепсин H относится к эндоаминопептидазам, способен гидролизовать белки и пептиды с максимальной активностью при pH 6,0. Катепсин L – тиоловая эндопептидаза, присутствует в лизосомальной фракции, гидролизует различные белки с максимальной активностью при pH 5,0.

Лизосомальные экзопептидазы были открыты позднее эндопептидаз. В настоящее время установлено, что они наиболее активны на последних стадиях расщепления белковых молекул, когда под действием эндопептидаз образовалось много новых концевых групп.

Катепсин A – лизосомальная карбоксипептидаза, проявляет наибольшую активность по отношению к пептидам при pH около 5,6–6,9, не способен гидролизовать крупные молекулы белка, однако проявляет синергизм с действием катепсина D на белки мышц. Отличительной чертой катепсина A является способность гидролизовать синтетический субстрат карбобензокси-L-глютамил-L-тирозин.

Катепсин B_2 – относительно неспецифическая карбоксипептидаза, активируемая сульгидрильными соединениями; гидролизует полипептиды до свободных аминокислот с оптимумом pH 5,5–5,6. Катепсин B_2 осуществляет глубокий гидролиз полипептидных фрагментов, образующихся в результате действия эндопептидаз.

Катепсин C является типичной тиоловой экзопептидазой, которая расщепляет пептиды и их производные с оптимумом pH 5,0–6,0.

Являясь своеобразной аминопетидазой, принимает участие в деградации белка в комплексе с другими катепсинами, или выполняет функции трансфераз.

В настоящее время в саркоплазме, митохондриях и рибосомах клеток выделен ряд протеиназ, проявляющих максимальную активность в нейтральной среде (pH 7,0–8,0) при наличии ионов кальция. Кальцийзависимые тканевые протеиназы получили название кальпаинов.

Лизосомальные протеиназы – катепсины и кальцийзависимые протеиназы – кальпаины участвуют в автолитической деструкции тканей двояким образом: непосредственно воздействуя на основные компоненты клеточных элементов и путем активации других протеолитических ферментов.

Определяющую роль в деградации белков играют катапсины L, B, H и D, при этом важное место в процессе внутриклеточного протеолиза отводится катепсину D.

Действуя на разные субстратные фрагменты, катепсины оказывают существенное влияние на структуру белковых компонентов. Это вносит вполне определенный вклад в диссоциацию образовавшихся на этапе посмертного окоченения белковых агрегатов, ведет к появлению свободных сульфгидрильных групп и частичному восстановлению свойств мышечной ткани, утраченных в процессе окоченения.

В результате действия катепсинов на белки при правильном развитии автолитических процессов мясо приобретает нежность, сочность, выраженные вкус и аромат. Характер и глубина автолитических изменений в мясе влияют на его качество и пищевую ценность.

Изучение и целенаправленное использование биохимических свойств тканевых ферментных систем необходимы для регулирования и интенсификации технологических процессов получения свежего мяса и продуктов его переработки.

В получении продуктов с заданными свойствами управление технологическими процессами осуществляется путем воздействия на основные ферментные системы мяса внешних факторов: температуры, pH среды и т. д., для чего необходимо знать условия проявления активности катепсинов.

Таким образом, имея объективную информацию о характере и глубине изменений структурных компонентов тканей, активности

катепсинов, возможно предполагать условия максимального использования животных тканей для получения качественных мясных продуктов.

Биохимические свойства крови

Кровь убойных животных – один из важнейших источников высокоценного животного белка. По содержанию белка кровь практически не отличается от мяса и содержит лишь на 5–10 % больше воды. Реакция среды слабощелочная, почти нейтральная. Кровь обладает способностью к пенообразованию и образованию эмульсий. Коэффициент перевариваемости крови составляет 94–96 %, т. е. она почти полностью усваивается организмом. Кроме того, содержание в ней биологически активных веществ делает ее более полноценным источником продуктов питания.

В производстве мяса и мясопродуктов используют цельную кровь, плазму (фракцию крови без форменных элементов) и сыворотку (плазма без фибриногена). Особенностью цельной крови и плазмы является свертывание.

При глубоких повреждениях кровь обильно вытекает из сосудов и через некоторое время свертывается в результате превращения растворимого белка плазмы фибриногена в нерастворимый фибрин. Механизм свертывания крови очень сложен и регулируется с помощью каскадной системы реакций, протекающих с участием ферментов и без них.

«Пусковым механизмом» свертывания крови является тканевый фактор тромбопластин, являющийся липопротеидом, который проявляет протеолитическую активность и охарактеризован еще недостаточно. При повреждении сосудов он освобождается и инициирует свертывание. В результате реакций тромбопластина с ионами Ca_2^+ и некоторыми белками плазмы (проакцелерином и проконвертином) образуется фермент тромбокиназа.

Второй путь образования тромбокиназы связан с распадом тромбоцитов и выделением из них тромбопластина, который впоследствии взаимодействует с ионами Ca_2^+ и некоторыми глобулинами плазмы.

Последняя стадия механизма свертывания – протеолиз фибриногена тромбином с образованием нерастворимого фибрина.

Итак, тромбин – важный фермент системы свертывания крови, активно гидролизующий фибриноген. Способность тромбина специфически расщеплять связь между остатками аргинина и глицина свидетельствует о сходстве тромбина с трипсином. Тромбин имеет молекулярную массу 33 700 и состоит из двух полипептидных цепей (А и В).

Последовательность аминокислот вокруг серина в активном центре тромбина: Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro аналогична их последовательности в активном центре сериновой протеиназы поджелудочной железы. Как и панкреатические сериновые протеиназы, тромбин синтезируется в виде неактивного зимогена – протромбина, который имеет молекулярную массу 66 000. Протромбин синтезируется в печени при наличии достаточного количества витамина К.

Переход протромбина в тромбин эффективно протекает при участии фермента тромбокиназы, в присутствии ионов Ca_2^+ и других факторов свертывания.

В результате протеолитического расщепления связи аргинин – треонин с аминоконца протромбина высвобождается фрагмент молекулярной массой 32 000. Последующее расщепление связи аргинин – лейцин приводит к высвобождению активного тромбина.

Таким образом, в результате совершения серии протеолитических реакций протромбин превращается в активную форму – тромбин с ярко выраженной специфичностью к разрыву пептидных связей между аргинином и глицином. Такая специфичность действия тромбина обеспечивает превращение фибриногена в фибрин в процессе свертывания крови.

Таким образом, свертывание крови включает эффективно регулируемую серию превращений неактивных зимогенов в активные ферменты, ведущую в конечном итоге к образованию тромбина и затем фибрина. За небольшим исключением все активируемые факторы свертывания представляют собой сериновые протеиназы. Все они ингибируются, подобно трипсину, диизопропилфторфосфатом и гидролизуют пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и глицина.

Свертывание крови в значительной степени затрудняет ее промышленную переработку. Для исключения или замедления свертывания крови выводят или нарушают активизацию одного из компо-

нентов системы. Вещества, вызывающие целевое действие, называются антикоагулянтами или стабилизаторами. Химическая природа и механизм их действия на свертывающую систему различен. В связи с этим антикоагулянты подразделяются на две большие группы – физиологические и нефизиологические. Действие их, как правило, очень быстрое. Введение стабилизаторов производят сразу после изъятия крови до начала образования сгустка. Физиологические стабилизаторы предотвращают прижизненное свертывание крови, инактивируя важнейшие системы свертывания. К ним относятся гепарин, антитромбопластин, антитромбин и др.

При пропускании крови, например, через слой ионообменной смолы 50 % кальция заменяется натрием. Снизить концентрацию Ca_2^+ достаточно вдвое для того, чтобы кровь не свертывалась. Существуют и другие подходы к стабилизации крови.

Кровь убойных животных широко применяется для производства мясопродуктов. Это связано с тем, что белки плазмы крови, помимо высокой пищевой и биологической ценности, имеют высокие функциональные свойства: высокую эмульгирующую, водосвязывающую способность, обладают способностью к геле-, пено- и волокнообразованию, что обусловлено наличием альбуминов и фибриногена в ее составе.

Биохимическая активность животных тканей

При жизни животных организмов некоторые органы и ткани способны накапливать и секретировать биологически активные вещества, которые выполняют важнейшие функции в поддержании жизнедеятельности. При убое сельскохозяйственных животных совокупность таких источников называют ферментно-эндокринным сырьем и используют для производства органотерапевтических препаратов, которые в свою очередь имеют широкое применение в теоретической науке, медицине, фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве и при переработке пищевого сырья. По механизму действия, свойствам, физиологическому и лечебному эффекту эти вещества подразделяют на гормоны (гормональные препараты) и ферменты (ферментные препараты). Гормоны выделяют главным образом из эндокринных желез (железы внутренней секреции). К такому сырью относятся гипофиз, паращитовидные железы,

щитовидная, поджелудочная, половые железы, надпочечники. Ферментные препараты получают преимущественно из слизистой оболочки желудков свиней и сычугов крупного рогатого скота, молочных ягнят и телят, слизистой оболочки тонкого отдела кишечника, а также поджелудочной и слюнной желез.

Важнейшими условиями правильной организации сбора ферментно-эндокринного сырья являются быстрое извлечение его из туши животного, соблюдение санитарно-гигиенических требований, предотвращающих загрязнение и микробное инфицирование.

Под каталитическим воздействием ферментов осуществляются процессы гидролиза, фосфоролиза, переноса различных групп (метильных радикалов, остатков фосфорной кислоты и т. д.), окисления, восстановления и т. д. При посредстве ферментов реализуется влияние как внутренних, генетических, так и внешних, природных факторов на развитие организма. Тончайшие различия строения ферментов определяют видовые особенности организмов, а в нарушении биосинтеза некоторых из них лежат причины возникновения наследственных и других заболеваний.

Будучи выделены из клеток, ферменты не утрачивают способности осуществлять каталитическую функцию. На этом основано их практическое применение в пищевой, легкой, фармацевтической промышленности. В связи с этим ткани животных, в которых активно синтезируются ферменты, имеют практическое значение как источники для их получения. Интерес представляют ткани низкой пищевой ценности, клетки которых синтезируют ферменты.

Традиционно с этой целью используются слизистые оболочки, богатые пищеварительными ферментами, которые в метаболизме животного организма выполняют функции гидролитического распада пищевых веществ: 1) секрет слюнных желез (слюна), особое значение в функции которой принадлежит амилазе, а также лизоциму; 2) желудочный сок, содержащий пепсин, реннин и липазу (первые два из которых активируются соляной кислотой желудочного сока); 3) секрет поджелудочной железы, желчь и кишечный сок, богатые трипсином, химотрипсином, липазой, амилазой, рибонуклеазой и др.

Пепсин, трипсин и химотрипсин выделяются железистыми клетками в виде неактивных предшественников – зимогенов: пепсиногена, трипсиногена и химотрипсиногена. Их активные центры

блокированы фрагментами полипептидной цепи, после отщепления которых ферменты приобретают активность.

В группе протеолитических ферментных препаратов животного происхождения наибольший практический интерес представляют ферментные препараты, вырабатываемые из поджелудочной железы убойных животных, а также пепсин, вырабатываемый из слизистой оболочки сычугов крупного рогатого скота.

Поджелудочная железа содержит комплекс ферментов, около 50 % которых составляют трипсин и химотрипсин. Они выделены в кристаллическом виде и всесторонне изучены. Комплексный препарат ферментов поджелудочной железы называют панкреатином.

Отечественной промышленностью вырабатывается достаточно широкий спектр ферментных препаратов для медицины, препаративной практики, пищевой и перерабатывающей промышленности.

Гормоны осуществляют гуморальную регуляцию обмена веществ и координацию функций организма. Они регулируют размножение, рост и развитие организма, влияют на дифференцировку тканей, формирование функций, на поддержание гомеостаза центральной нервной системы, участвуют в адаптационных реакциях на внешние раздражители (стресс) и т. д.

Гормоны взаимодействуют со специфическим для данного гормона рецептором (часто это белки), вызывая ряд биохимических изменений в клетке. В зависимости от механизма взаимодействия гормонов с рецептором все гормоны можно разделить на две группы: 1) гормоны, не проникающие в клетку и взаимодействующие с рецепторами на наружной стороне мембраны; 2) гормоны, проникающие внутрь клетки и взаимодействующие с рецепторами в цитоплазме клеток.

В клетке имеются специальные механизмы, которые прекращают действие гормонов, т. е. влияют на обратимое соединение гормон – рецептор. Разрушение гормонов происходит в печени.

Эндокринные заболевания возникают не только при гипер- или гипофункции эндокринных желез, но также при интенсивном распаде гормонов или при нарушении функции рецепторов, без которых гормон не проявляет своего действия.

Гормонами (от греч. гормао – побуждаю, возбуждаю, поощряю) называют группу химических соединений, вырабатываемых пре-

имущественно железами внутренней секреции, не имеющими прямого пищевого значения, и оказывающими регулирующее влияние на процессы обмена веществ и функционирование органов и тканей.

Гормоны интегрируют обмен веществ, регулируя соподчиненность и взаимосвязь разнообразных химических реакций в различных органах и тканях и организме в целом. В свою очередь, деятельность желез внутренней секреции, продуцирующих гормоны, контролируется центральной нервной системой.

Действие гормонов в организме следующее: 1) изменяют проницаемость мембран для определенных веществ, например, для глюкозы, аминокислот; 2) регулируют активность отдельных ферментов путем аллостерического воздействия; 3) регулируют синтез ферментов, действуя на генетический аппарат клетки; 4) влияют на образование белковой части фермента (или на распад ферментов) и образование коферментов.

Гормоны млекопитающих по химической природе можно разделить на три большие группы: 1) белки и полипептиды; 2) стероиды; 3) прочие гормоны, в том числе амины, образующиеся в ходе метаболизма из аминокислот.

Наиболее изученным и важным является гормон инсулин, химическая и пространственная структура которого расшифрована.

Некоторые полипептидные гормоны, в том числе инсулин и глюкагон, подобно протеолитическим ферментам желудка и поджелудочной железы, синтезируются в клетках эндокринных желез в виде неактивных предшественников, или прогормонов. Пример – инсулин, превращающийся в активную форму путем ферментативного отщепления части полипептидной цепи. Источники основных представителей каждой из групп гормонов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Источники основных гормонов

Наименование	Место секреции
1	2
Пептидные гормоны	
Тиролиберин	Гипоталамус
Кортикотропин	Передняя доля гипофиза
Вазопрессин	Задняя доля гипофиза
Инсулин	Поджелудочная железа

Продолжение таблицы 2

1	2
Глюкагон	То же
Стероидные гормоны	
Кортизол	Кора надпочечников
β-Эстрадиол	Яичники
Тестостерон	Семенники
Прогестерон	Желтое тело
Амины	
Адреналин	Мозговой слой надпочечников
Тироксин	Щитовидная железа

В последнее время предпринята попытка классифицировать гормоны, исходя не только из их химической природы, но и с учетом их происхождения и физиологической функции.

Известны биологические (испытание на животных) и химические способы определения гормонов. Реакции качественного определения специфичны для каждой группы гормонов.

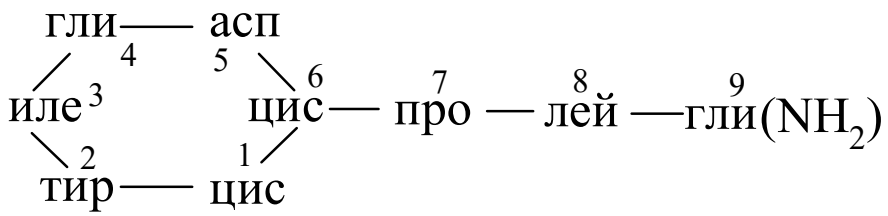
Результатом реакции йода с крахмалом является соединение синего цвета.

К качественным реакциям на гормоны мозгового слоя надпочечников (адреналин, норадреналин) относятся: реакция с хлоридом железа (III), с диазореактивом, с йодатом калия.

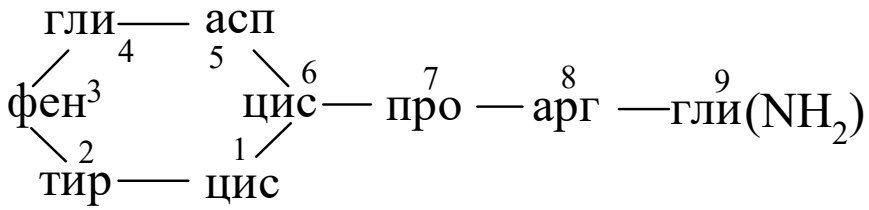
Количественные методы определения гормонов основаны на проведении специфических реакций с образованием окрашенных или флюоресцирующих продуктов, определяемых колориметрически (количественное определение адреналина по Фолину; метод основан на определении интенсивности синего окрашивания, возникающего при взаимодействии адреналина с солями фос-форновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот) или флюорометрически (например, количественное определение адреналина и норадреналина в моче). Принцип метода состоит в том, что некоторые вещества при ультрафиолетовом облучении их начинают флюоресцировать, т. е. сами становятся источником нового (вторичного) излучения. Излучение регистрируют и количественно измеряют при помощи специального прибора – флюорометра. Интенсивность флюоресценции пропорциональна концентрации вещества в растворе.

Важнейшими пептидными гормонами являются окситоцин, вазопрессин, гастрин, глюкагон, инсулин, адренокортикотропин, тиреотропин.

Окситоцин и вазопрессин – 9-членные полипиптиды сходной структуры:



окситоцин



вазопрессин

Они выделены из задней доли гипофиза. Окситоцин вызывает сокращение мышечных волокон, способствует нормальному протеканию родов. Вазопрессин в известной мере сходен с окситоцином по функциональной активности: стимулирует сокращение гладких мышц сосудов, а также участвует в регуляции водного баланса организма и осмотического давления плазмы крови.

Гастрин – 17-членный пептид, выделяемый слизистой желудка. Он стимулирует секрецию желудочного сока, способствует выделению секрета поджелудочной железы, усиливает тонус и сокращение мышц желудка и тонкого кишечника.

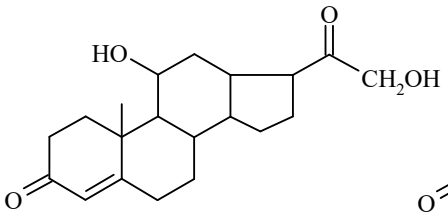
Глюкагон – 29-членный пептид, синтезируется в α-клетках островковой части поджелудочной железы, способствует деструкции углеводов в процессе гликогенолиза.

Адренокортикотропин – 39-членный пептид, продуцируемый передней долей гипофиза, оказывает разностороннее действие: повышает активность фосфорилазы, липазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, усиливает синтез белков и нуклеиновых кислот и т. д.

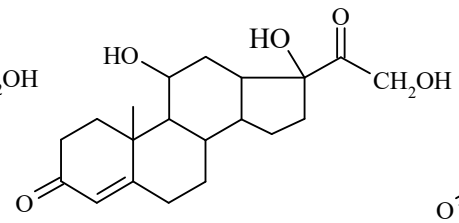
Основная функция в организме сводится к регуляции биосинтеза кортикостероидов надпочечными железами.

Тиреотропин – белок, выделяемый передней долей гипофиза. Представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 28 300, состоящий из двух субъединиц с молекулярными массами 13 600 и 14 700, исключительно богатых дисульфидными мостиками (5 и 6 соответственно). Тиреотропин стимулирует деятельность щитовидной железы. В свою очередь, выделение тиреотропина регулируется по принципу обратной связи гормонами щитовидной железы.

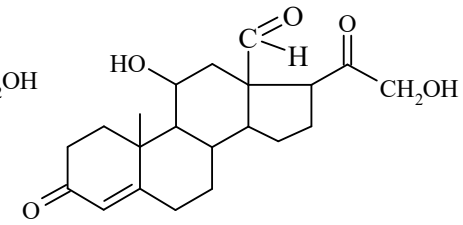
Стероидные гормоны представляют собой производные полициклических спиртов – стеролов, у которых окислена боковая цепь. В корковом слое надпочечников продуцируется более сорока различных стероидов, которым присвоено общее название – кортикостероиды. Восемь из них являются стероидными гормонами коры надпочечников. Наибольшее распространение и значение в организме имеют кортикостерон, 17-оксикортикостерон (гидрокортизон) и альдостерон (в сумме они составляют 4/5 всех кортикостероидов коры надпочечников):



Кортикостерон

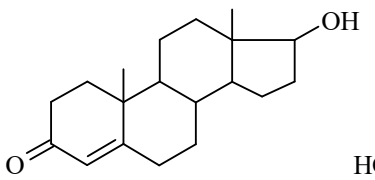


17-оксикортикостерон

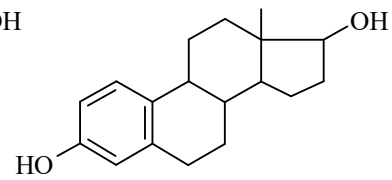


Альдостерон

В мужских и женских половых железах, а также в надпочечных железах синтезируется 10 стероидов, обладающих свойствами половых гормонов. Важнейшее значение из них имеют тестостерон (мужской половой гормон) и эстрадиол (женский половой гормон):



Тестостерон

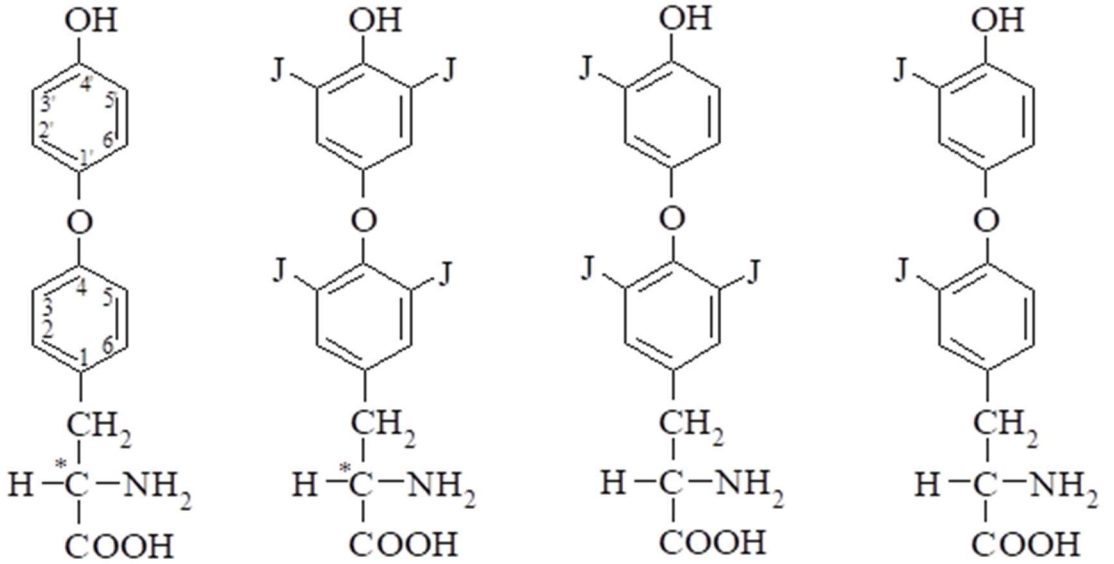


Эстрадиол

Эстрадиол принадлежит к группе экстрогенов (женских половых гормонов), которые в известной мере влияют на функционирование почти всех тканей в организмах позвоночных. Основное дей-

ствие их – стимуляция роста и созревания органов размножения самок и поддержание их способности к воспроизведению. Эстрадиол оказывает также влияние на обмен углеводов, белков и нуклеиновых кислот, активирует ряд ферментов лимоннокислого цикла.

Прочие гормоны. Из гормонов, не являющихся по своей химической природе пептидами и стероидами, у человека и животных хорошо известны адреналин, тироксин и простагландины, а также аналогичные им соединения.



L-Тиронин | L-Тироксин 3,5,3',5'-тетраиод тиронин | L-3,5,3'-трииод тиронин | L-3,3',-дииод тиронин

Тироксин – продуцируется щитовидной железой и является представителем группы йодтиронинов:

Биосинтез тиреоидных гормонов осуществляется в щитовидной железе при посредстве особого белка – тиреоглобулина – путем конденсации двух молекул дийодтирозина в молекулу тетрайодтиронина. Связываясь со специфическими глобулинами крови, йодтиронины доставляются к клеткам организма, где проявляют свое действие.

Механизм действия йодтиронинов изучен недостаточно. Считают, что эти гормоны влияют на скорость метаболизма и потребление кислорода тканями. В итоге усиления окислительных процессов повышается интенсивность расщепления углеводов, жиров и белков в процессе обмена веществ с освобождением большого количества энергии.

Простагландины – соединения с широким спектром гормонального действия, являются производными полиеновых 20-углеродных жирных кислот, из которых они синтезируются во многих тканях человека и животных, преимущественно в репродуктивных органах.

Действие простагландинов отличается крайне разнообразными физиологическими и фармакологическими эффектами. В связи с этим они находят все более широкое применение при создании принципиально новых лекарственных средств. Это связано с тем, что механизм их действия сводится к усилению или ослаблению влияния многих других гормонов на фундаментальные стороны обмена веществ на генетическом и других уровнях. Считают, что простагландины являются модуляторами гормон-рецепторных комплексов, т. е. способны изменять их активность, опосредуя действие гормонов.

Не стимулированный уровень гормонов очень низок (в пределах микромолярных и ниже концентраций). В силу этого их выделение, идентификация и количественное определение связаны с определенными трудностями.

Контрольные вопросы

1. Опишите механизм автолитических превращений мышечной ткани.
2. Что играет определяющую роль в деградации белков?
3. Какую кровь используют в производстве мяса и мясопродуктов?
4. Опишите биохимическую активность животных тканей.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1
ОЦЕНКА ГЛУБИНЫ И ХАРАКТЕРА АВТОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ МЕТОДАМИ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НЕБЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Цель и задачи работы: приобрести практический навык в оценке технологической пригодности мяса на основе анализа небелковых веществ мышечной ткани. В задачи работы входит определить количественное содержание гликогена, неорганических фосфорных соединений, АТФ, глюкозы; дать органолептическую оценку мяса; оценить технологическую пригодность мяса.

Методические указания

В течение первых суток после убоя развитие посмертного окоченения приводит к снижению pH от 6,5–7,0 до 5,5–5,6, отсутствию выраженного вкуса и аромата. Сравнительные органолептические показатели в зависимости от глубины автолитических превращений даны в таблице 3.

Таблица 3 – Органолептические показатели пищи, приготовленной из мяса на разных стадиях автолиза

Наименование продукта	Несозревшее мясо	Созревшее мясо
Вареное мясо	Жесткое, сухое, отсутствует специфический приятный вкус и аромат	Нежное, сочное, со специфическим приятным вкусом и запахом
Бульон	Мутный, отсутствует специфический приятный вкус и аромат мясного бульона	Прозрачный, со специфическим приятным вкусом и ароматом

В связи с отсутствием поступления кислорода в организм ресинтез гликогена в мясе после убоя идти не может и начинается его анаэробный распад, который протекает по пути фосфоролиза и амилолиза с образованием молочной кислоты и глюкозы. Это коррелирует с изменением pH и АТФ.

Через 24 ч гликолиз приостанавливается вследствие исчерпания запасов АТФ и накопления молочной кислоты, подавляющей фосфоролиз.

Накопление молочной кислоты приводит к смещению pH в кислую сторону, в результате чего возрастает устойчивость мяса к действию гнилостных микроорганизмов; снижается растворимость миофибриллярных белков (изоэлектрическая точка при pH 4,7–5,4), уровень их гидратации, величина водосвязывающей способности; происходит набухание коллагена соединительной ткани; повышается активность катепсинов (pH-оптимум 5,3), вызывающих гидролиз белков на более поздних стадиях автолиза; разрушается бикарбонатная система ткани с выделением углекислого газа; создаются условия для интенсификации реакций цветообразования вследствие перехода двухвалентного железа в трехвалентное в молекуле миоглобина; изменяется вкус мяса; активизируется процесс окисления липидов.

Очевидно, общее количество и соотношение специфических продуктов биохимических реакций указывает на характер и глубину автолиза, о которых можно судить путем анализа биохимических веществ небелковой природы.

Количественное определение глюкозы в мышечной ткани проводят методом Бертрана. Метод основан на восстановлении щелочного раствора окиси меди в закись и учете последней путем воздействия на нее раствором сульфата окисного (трехвалентного) железа, сильно подкисленного серной кислотой. Количество восстановленного при этом железа определяется титрованием перманганатом калия. Процесс сводится к следующим реакциям:

$$2CuO + \text{редуцирующий сахар} \rightarrow Cu_2O,$$

$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 + H_2SO_4 = 2CuSO_4 + 2FeSO_4 + H_2O,$$

$$10FeSO_4 + 2KMnO_4 + 8H_2SO_4 = 5Fe_2(SO_4)_3 + 2MnSO_4 + 8H_2O.$$

Из уравнений следует, что 1 $см^3$ раствора перманганата калия молярной концентрацией 0,1 моль/$дм^3$ соответствует 6,35 мг меди. Зная количество миллилитров раствора $KMnO_4$, пошедших на титрование сульфата железа, находят, какому количеству миллиграммов меди оно соответствует, и определяют количество сахара в исследуемом растворе.

Выполнение работы по оценке глубины и характера автолитических превращений мышечной ткани определенного вида убойных животных или птицы осуществляется комплексно бригадами студентов по 2–3 человека.

Каждой бригаде выдается задание по изучению динамики изменения одного-двух конкретных биохимических показателей при рекомендованных сроках хранения. Бригады выбирают методы исследования, обосновывают выбор, проводят законченный цикл исследований в соответствии с конкретными методиками.

О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я : образцы мышечной ткани разных видов убойных животных и птицы различных сроков хранения массой по 50 г. Хранение образцов осуществляется при температуре 4 °С, относительной влажности воздуха 80 %

Материалы, реактивы, оборудование: весы технические; водяная баня; электроплитка, асбестовая сетка; масляный насос; штатив Бунзена; скальпель; кварцевый песок или толченое стекло; бумажные фильтры; порошковый асбест; песочные часы на 3 мин термометр; индикаторная бумага; фарфоровые ступки; колбы конические вместимостью 150 $см^3$; колбы мерные вместимостью 50 и 100 $см^3$; часовые стекла; воронки; колбы Бунзена с резиновыми пробками, в которые вставлены стеклянные фильтры № 2 или № 3; бюретки; пипетки объемные вместимостью 5, 10 и 20 $см^3$; стеклянные палочки с резиновыми наконечниками, раствор медного купороса (реактив А); щелочной раствор сегнетовой соли (раствор Б); раствор сульфата окисного железа; раствор $KMnO_4$ молярной концентрацией 0,1 моль/$дм^3$; раствор $ZnSO_4$ с массовой долей 15 %; раствор желтой кровяной соли с массовой долей 10 %; $CaCO_3$; раствор HCl с массовой долей 17 %; насыщенный раствор Na_2CO_3; толуол в капельнице.

Подготовка проб

1. Для определения pH мяса готовят водную вытяжку в соотношении 1 : 10, для чего навеску образца мяса массой (10,00 ± 0,02) г тщательно измельчают (ножницами или на мясорубке), помещают в химический стакан вместимостью 50 $см^3$ и экстрагируют дистиллированной водой в течение 30 мин при температуре окружающей

среды и периодическом помешивании стеклянной палочкой. Экстракт фильтруют через складчатый бумажный фильтр и используют для определения интересующего показателя.

2. Подготовка проб для количественного определения гликогена, молочной кислоты, АТФ в мышечной ткани – в соответствии с методическими указаниями.

3. Для приготовления вытяжки сахаров (глюкозы) навеску предварительно измельченной мышечной ткани массой (10,00 ± 0,02) г тщательно растирают в ступке с 1–2 г кварцевого песка и количественно переносят в коническую колбу вместимостью 150 $см^3$ с 50 $см^3$ воды. Затем колбу ставят на 30 мин на водяную баню при температуре 70…80 °С. Из охлажденной смеси удаляют белки и коллоидные вещества, мешающие определению сахаров, путем добавления в колбу 5 $см^3$ раствора сульфата цинка с массовой долей 15 % и 5 $см^3$ раствора желтой кровяной соли с массовой долей 10 %. Смесь перемешивают, фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и промывными водами доводят до указанного объема. На этом этапе работу можно прервать, добавив в вытяжку несколько капель толуола и закрыв колбу пробкой.

Ход работы

1. Определение pH. pH водного экстракта мышечной ткани определяют на потенциометре (pH-метре) любой марки. Результаты фиксируют.

2. Количественное определение гликогена и молочной кислоты в мышечной ткани. Выполняют в соответствии с рекомендациями.

3. Определение АТФ – ведут в точном соответствии с рекомендациями.

Количественное определение глюкозы в вытяжке мышечной ткани по методу Бертрана.

В коническую колбу помещают 20 $см^3$ вытяжки, добавляют по 20 $см^3$ реактивов А и Б, ставят полученную смесь на электроплитку (на асбест), нагревают до кипения и кипятят 3 мин. Выпадает красный осадок закиси меди. Жидкость над осадком должна иметь си-

ний цвет; если она бесцветна, нужно взять меньший объем вытяжки – 10 или 15 см^3, доведя объем до 20 мл^3 дистиллированной водой.

Колбу Бунзена со стеклянным фильтром закрепляют при помощи лапок штатива и присоединяют к масляному насосу. Покрывают фильтр слоем асбеста толщиной 1–1,5 мм, для чего разводят порошковый асбест в горячей воде, выливают на фильтр и отфильтровывают при разрежении.

Сливают жидкость над осадком Cu_2O декантацией (не взбалтывая) по стеклянной палочке на стеклянный фильтр и осторожно отсасывают (не досуха, чтобы осадок, попавший на стеклянный фильтр, не окислялся). Затем осадок в колбе и на фильтре несколько раз промывают горячей дистиллированной водой до полного обеспечения промывных вод, стекающих с фильтра.

Колбу отделяют от фильтра, тщательно ее промывают вначале водопроводной водой, а затем дистиллированной, вставляют пробку с фильтром. Осадок в колбе и на фильтре растворяют сернокислым железом в серной кислоте, добавляя его каждый раз небольшими порциями и отсасывая насосом. После растворения осадка колбу и фильтр промывают холодной дистиллированной водой до отсутствия кислой реакции в промывных водах. Содержимое колбы титруют раствором перманганата калия до слабо-розового окрашивания.

Массовую долю глюкозы (X, %) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{nV \cdot 100}{V_1 m \cdot 1000}, \qquad (3)$$

где n – количество глюкозы во взятой вытяжке, мг;

V – объем всей вытяжки, см^3;

V_1 – объем взятой для определения вытяжки, см^3;

m – навеска, г.

Пример расчета

При определении глюкозы в 20 см^3 экстракта на титрование израсходовано 15 см^3 раствора перманганата калия молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3. Масса меди составляет 6,36 · 15 = 954 мг.

Эта масса меди соответствует 50 мг глюкозы, следовательно, содержание глюкозы в исследуемом растворе 250 мг %.

Оформление результатов

Полученные экспериментальные данные представляют в виде таблицы:

Наименование и характеристика образца мышечной ткани	pH	Содержание, мг %			
		гликогена	молочной кислоты	глюкозы	АТФ

По совокупности показателей делают выводы и формулируют заключение.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Цель и задачи работы: освоить методику определения протеолитической активности катепсинов мышечной ткани убойных животных. В задачи работы входит получение экстракта катепсинов из мышечной ткани и определение протеолитической активности фотометрическим методом в различных условиях реакции.

Методические указания

Рекомендуется использовать мышечную ткань на разных стадиях автолиза. При изучении влияния температуры на активность катепсинов субстраты (растворы стандартных белков) прогревают до температур соответственно 20, 40, 50, 60 °С.

При изучении влияния pH на ферментативную активность мышечного экстракта субстрат растворяют и доводят pH раствором HCl молярной концентрацией 0,3 моль/дм^3 до 3,0; 4,0; 5,0; 6,0. Для определения активности протеиназ используют метод Ансона в модификации Е. Каверзневой, в котором о каталитических свойствах судят по степени расщепления стандартных белков с образованием низкомолекулярных продуктов: пептидов и аминокислот, в частности, по накоплению тирозина.

За единицу протеолитической активности (ПА) принято количество фермента, которое за одну мину при 30 °С катализирует переход в не осаждаемое ТХУ состояние такого количества субстрата, которое содержит 1 мкмоль тирозина (1,181 мг).

Протеолитическая активность экстракта катепсинов (ПА) выражается числом протеолитических единиц в 1 см^3 ферментного раствора (ед./см^3).

Метод определения протеолитической активности, приведенный в данной работе успешно может быть применен и при анализе пищеварительных ферментов: пепсина, панкреатина, химотрипсина и брипсина.

Объект исследования: мышечная ткань одного или разных видов животных (говядины, свинины, баранины), содержащая комплекс ферментов.

Материалы, реактивы, оборудование: дистиллированная вода; бумажные фильтры; водяные бани и термостаты; раствор казеината натрия или гемоглобина с массовой долей 2 % с pH 3; 4; 5; 6; раствор ТХУ с массовой долей 2 %; раствор карбоната натрия молярной концентрацией 0,5 моль/дм^3; рабочий раствор реактива Фолина; фотоэлектроколориметр.

Подготовка проб

Мышечную ткань очищают от жировой и соединительной ткани, измельчают сначала на мясорубке, а затем гомогенизируют. Навеску измельченного сырья смешивают с дистиллированной водой в соотношении 1 : 20 и экстрагируют при (20 ± 5) °С при периодическом перемешивании смеси в течение 30 мин. Затем смесь фильтруют через бумажный фильтр, фильтрат используют в качестве вытяжки протеолитических ферментов – катепсинов.

Ход работы

Субстрат (раствор казеината натрия или гемоглобина с массовой долей 2 % с заданным значением pH) объемом 2 см^3 помещают в пробирку, прогревают до нужной температуры (в соответствие с конкретным заданием) и прибавляют 2 см^3 исследуемого экстракта протеолитических ферментов мышечной ткани (время внесения фиксируют). Смесь выдерживают в течение 15 мин, а затем прибавляют 4 см^3 раствора с массовой долей ТХУ 2 %, встряхивают и выдерживают 20 мин (количество вносимого фермента рассчитывают так, чтобы в смеси присутствовал избыток субстрата).

Параллельно с опытной готовят контрольную пробу, смешивая реактивы в обратной последовательности. Для этого в контрольную пробирку помещают 2 см^3 ферментной вытяжки, прибавляют 4 см^3 раствора ТХУ с массовой долей 2 %, встряхивают и выдерживают 15 мин. Затем прибавляют 2 см^3 субстрата, встряхивают и выдерживают 20 мин при заданной температуре.

Реакционные среды (контроль и опыт) фильтруют через бумажный фильтр. В чистые сухие пробирки отбирают по 1 см^3 прозрачного фильтрата и прибавляют 5 см^3 раствора Na_2CO_3 молярной концентрацией 0,5 моль/дм^3 и 1 см^3 рабочего раствора реактива Фолина.

Смесь встряхивают и выдерживают 20 мин. После этого окрашенный раствор фотоколориметруют против контроля при длине волны $\lambda = 670$ нм с красным светофильтром (№ 9), в кюветах с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм.

Протеолитическая активность (ПА, ед./см^3)

$$ПА = (4Д \cdot К)/(ТЭ \cdot Т), \quad (4)$$

где Д – оптическая плотность раствора;

К – разведение;

ТЭ – тирозиновый эквивалент, определяемый по калибровочному графику для данного реактива Фолина;

Т – продолжительность гидролиза, мин; Т = 15 мин.

Оформление результатов

Экспериментальные данные оформляют в таблице вида:

Наименование изучаемого объекта	Протеолитическая активность катепсинов		Условия реакции	
	Д	ПА, ед./см^3	pH	температура, ^oC

По полученным данным строят графические зависимости активности катепсинов f(A), где А – исследуемый фактор.

После построения графиков студенты самостоятельно описывают полученные результаты, делают выводы и формулируют заключение.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Цель и задачи работы: приобрести практический навык в анализе компонентов свертывающей системы крови. В задачи работы входит изучение действия ионов кальция на свертываемость крови и ее фракций и количественное определение содержания тромбина.

Методические указания

В технологической практике весьма важно не допустить свертывание крови, так как она является весьма ценным сырьевым источником в получении продуктов пищевого, лечебно-профилактического и медицинского значения. В связи с этим определение факторов свертывания, улучшение механизмом их действия лежит в основе разработки новых подходов глубокой переработки крови. Одним из главных компонентов свертывающей системы является тромбин и кальций. Действие первого связано с гидролизом фибриногена, а другой участвует практически на всех стадиях биохимических превращений, активируя ферментные системы.

Появление тромбина в среде свидетельствует о начале развития завершающей стадии свертывания крови. Немаловажная информация связана с установлением действия кальция на белки свертывающей системы.

Свертывание крови включает эффективно регулируемую серию превращений неактивных зимогенов в активные ферменты, ведущую в конечном итоге к образованию тромбина и затем фибрина. Протеолиз фибриногена тромбином с образованием нерастворимого фибрина – заключительная стадия механизма свертывания.

На практике часто используют различные приемы для предотвращения свертывания крови, которое сводится к исключению одного из факторов системы свертывания.

При промышленной переработке крови широко применяют стабилизаторы, действие которых выводит Ca^{2+} из системы свертывания. В качестве стабилизаторов используют оксалаты, цитраты, фосфаты, сульфаты и др. При действии этих реагентов образуются нерастворимые кальциевые соли.

Немаловажное значение имеет количество образовавшегося тромбина, так как именно он осуществляет переход фибриногена в фибрин с образованием сгустка.

О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я : стабилизированная кровь различных видов животных, получаемая в условиях производства; плазма и сыворотка крови, которые выделяют в лабораторных условиях (или используют фракции при промышленной переработке крови убойных животных).

Материалы реактивы, оборудование: раствор хлорида кальция 3 %, штатив с пробирками, химический стакан вместимостью 200–400 $см^3$, стеклянные палочки, пипетки вместимостью 1, 5 и 10 $см^3$, настольная центрифуга, термостат, холодильник, водяная баня.

Подготовка проб

Стабилизированную кровь животных хранят в холодильнике и используют для получения фракций.

Для получения плазмы в лабораторных условиях стабилизированную кровь животных (50 $см^3$) центрифугируют в течение 5–8 мин при 25–42 $с^{-1}$. Плазму (надосадочную жидкость) осторожно отбирают пипеткой и переносят в чистую сухую пробирку.

Для получения сыворотки нестабилизированную (или дестабилизированную добавлением раствора хлорида кальция с массовой долей 3 %) кровь объемом 150–200 $см^3$ помещают в химический стакан и ставят на 1 ч в термостат при 37 °С, затем переносят на холод.

Для лучшего отделения сгустка крови от сыворотки обводят сгусток по краям стакана стеклянной палочкой. Через 4–5 ч стояния на холоде сыворотка в виде прозрачной жидкости отделяется от кровяного сгустка. Отстоявшуюся сыворотку осторожно отбирают пипеткой.

Кровь, плазму и сыворотку используют для анализа.

Ход работы

1. Действие кальция на свертывающую систему крови и ее фракций

Готовят 6 пробирок для крови каждого вида животных. В одну пробирку помещают 2–3 $см^3$ стабилизированной крови, в другую – также 2–3 $см^3$ стабилизированной крови и добавляют 5–6 капель раствора с массовой долей хлорида кальция 3 %, в третью – 5–6 $см^3$ плазмы, в четвертую – 5–6 $см^3$ плазмы и 5–6 капель раствора хлорида кальция, в пятую – 5–6 $см^3$ сыворотки крови, в шестую – 5–6 $см^3$ сыворотки крови и 5–6 капель раствора хлорида кальция. Пробирки слегка встряхивают и ставят на водяную баню при 37 °С. Через 10–15 мин их вынимают и отмечают, где произошло свертывание.

Оформление результатов

Номер пробирки	Субстрат	Условия опыта	Результат

Заключение студенты формулируют самостоятельно.

2. Определение тромбина

В качестве источника тромбина используют свежую сыворотку крови, из которой готовят ряд разведений. В качестве источника фибриногена используют свежую плазму крови, предварительно нагретую до температуры 50…60 °С с последующей инкубацией в течение 30 мин. За единицу активности тромбина принимают минимальный объем тромбина ($см^3$), который вызывает свертывание.

Готовят 11 пробирок для крови животных. Во все пробирки, кроме первой, помещают по 1 $см^3$ раствора хлорида натрия с массовой долей 0,85 %. В первую и вторую пробирки добавляют по 1 $см^3$ неразбавленной сыворотки (раствор тромбина). Содержимое второй пробирки тщательно перемешивают, 1 $см^3$ смеси из второй пробирки переносят в третью. Содержимое третьей пробирки также перемешивают и 1 $см^3$ смеси переносят в четвертую пробирку и так далее до десятой пробирки, из которой 1 $см^3$ жидкости удаляют. Одиннадцатая пробирка содержит 1 $см^3$ раствора NaCl и служит контролем.

Во все 11 пробирок добавляют по 2 см^3 плазмы, предварительно инактивированной и разведенной в 10 раз раствором с массовой долей NaCl 0,85 % (раствор фибрина). Штатив с прбирками помещают в холодильник на 24 ч.

По истечении времени, осторожно наклоняя пробирки, определяют, в каких пробирках произошло свертывание. Количество тромбина (Х, ед.) вычисляют в той пробирке, где образовался еле заметный сгусток.

Количество тромбина (*X*, ед.) рассчитывают по формуле:

$$X=1/V, \qquad (5)$$

где V – объем тромбина сыворотки крови в пробирке с минимальным образованием сгустка, см^3.

Пример расчета. Образование сгустка зафиксировано в первых восьми пробирках. В девятой и последующих пробирках свертывания не произошло. В восьмой пробирке объем сыворотки составляет 0,0078 см^3:

объему сыворотки 0,0078 см^3 соответствует 1 ед. тромбина,

объему сыворотки 1 см^3 – X ед. тромбина.

$$X = 1/0{,}0078 = 128 \text{ ед.}$$

В норме 1 см^3 сыворотки содержит 62,5–250,0 ед. тромбина.

Оформление результатов

Студенты заносят экспериментальные данные в таблицу рекомендуемой формы:

Показатели	Номер пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Объем тромбина в пробирке										
Кол-во тромбина										
Осадок фибрина (+, –)	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА

Цель и задачи работы: приобрести практический навык в получении и анализе пепсина. В задачи работы входит получение пепсинового экстракта слизистой оболочки желудков свиней или сычугов крупного рогатого скота и определение молокосвертывающей активности (МСА).

Методические указания

Пепсин – пищеварительный фермент, гидролизующий белки, и проявляющий максимум активности при pH 2–4. Субстратная специфичность фермента проявляется в сродстве к разрыву пептидных связей, образованных гидрофобными радикалами.

Пепсин находит широкое применение при лечении желудочных заболеваний. Технические препараты пепсинов широко используют в пищевой технологии. Самый большой спрос находят пепсиновые препараты при получении творога, творожных масс и различных видов сыров в молочной промышленности, благодаря свойству специфически гидролизовать казеины молока, вызывая их коагуляцию.

При гидролизе пептидов пепсин проявляет высокую специфичность, имея ярко выраженное сродство к гидролизу пептидных связей, образованных карбоксильной группой фенилаланина и аминогруппой другой ароматической аминокислоты. При гидролизе белков фермент проявляет более широкую специфичность за счет функционирования в активном центре «первичных» и «вторичных» участков связывания субстрата. Он расщепляет пептидные связи, образованные тирозином, фенилаланином, триптофаном, а также лизином, гидролизует сложноэфирные связи. Продуктами гидролиза являются в основном пептиды и незначительная доля аминокислот. Он активно свертывает казеин молока, в связи с чем широко применяется в технологии белковых продуктов, вызывая коагуляцию белков молока.

Производство препарата пищевого пепсина включает: измельчение сырья (слизистой оболочки желудков свиней или сычугов крупного рогатого скота), экстрагирование и активацию фермента (pH 2,0), отделение экстракта от твердого остатка, высаливание или

осаждение фермента, сушку, измельчение, обезжиривание, просеивание, стандартизацию по активности.

Определение молокосвертывающей активности препаратов лежит в основе их стандартизации и расчета дозировки при получении продуктов с заданными свойствами. Методика состоит в фиксировании по секундомеру промежутка времени от внесения препарата в субстрат (молоко) до начала коагуляции казеина при проведении ферментативной реакции в стандартных условиях.

О б ъ е к т и с с л е д о в а н и я : свежая, высушенная или замороженная слизистая оболочка желудков свиней или сычугов крупного рогатого скота.

Материалы, реактивы, оборудование: слизистая оболочка желудка, соляная кислота, бумажные фильтры, молоко натуральное обезжиренное, секундомер; фарфоровая ступка; стаканы или колбы вместимостью 100–250 см^3.

Подготовка проб

Слизистую оболочку желудков свиней или сычугов крупного рогатого скота измельчают, настаивают со слабым раствором кислоты (раствор HCl концентрацией 0,01 моль/дм^3) в соотношении 1 : 20 в течении 30 мин. Смесь фильтруют через бумажный фильтр, фильтрат используют в качестве пепсинового экстракта.

Ход работы

100 см^3 свежего обезжиренного натурального молока подогревают до 35 °С и прибавляют 1 см^3 ферментной вытяжки слизистой желудков, фиксируя время внесения по секундомеру. Через 1–2 мин стеклянной палочкой периодически проверяют начало образования сгустка белков, которое также фиксируют по секундомеру.

Молокосвертывающая активность (МСА, ед./см^3) рассчитывается по формуле:

$$МСА = 2400 \cdot 100/(\tau \cdot v), \qquad (6)$$

где τ – время образования сгустка в молоке, с;

v – объем ферментов вытяжки, см^3.

Рекомендуется измерять температуру молока в диапазоне 30…55 °С, pH 5,5 ÷ 7,5.

Оформление результатов

Студенты делают расчеты и представляет отчет по выполнению всех операций, формулируют заключение на основе построения графиков зависимостей: МСА = f(pH) и МСА = f(t °С).

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Цель и задачи работы: освоить методы получения и определения гормона инсулина. В задачи работы входит получение экстракта инсулина; проведение качественного и количественного анализа экстракта.

Методические указания

В клинико-биохимических исследованиях применяются методы качественного и количественного определения гормонов, отклонения в содержании гормонов используют для диагностики заболеваний.

Среди гормонов, синтезируемых поджелудочной железой, наиболее важное значение имеют инсулин и глюкагон. Являясь веществом белковой природы, инсулин реагирует с образованием специфически окрашенных веществ, которые служат качественными реакциями и могут быть использованы для обнаружения его в экстрактах.

Количественное определение инсулина осуществляется химическим, так называемым фибриллярным методом. Сущность его состоит в том, что при нагревании инсулина в кислом растворе при 100 °С образуется тиксотропный гель, обладающий сильным двойным лучепреломлением. Путем нагревания в кислой среде при 100 °С и последующего охлаждения до минус 80 °С получается устойчивая фибриллярная модификация инсулина в растворе. Кристаллизующийся продукт, регенерированный из фибрилл, не отличается от исходного инсулина по физическим, химическим и биологическим свойствам.

Метод определения активности инсулина in vitro основан на специфической реакции удлинения инсулиновых фибрилл за счет нативного инсулина и определении их массы.

Принцип метода сводится к получению стандартного фибриллярного инсулина, который готовят из кристаллического инсулина активностью 24–25 и. е. в 1 мг. Заготовленный фибриллярный инсулин используют в качестве затравки при определении нативного инсулина.

Испытуемые растворы инсулина после затравки выдерживают в течение 24 ч при 48 °С. За этот срок инсулин осаждается, принимая фибриллярную форму.

Фибриллы отделяют от раствора центрифугированием, затем промывают различными растворителями на центрифуге для очистки инсулина от балластных белков и примесей. Полученный осадок высушивают над пятиокисью фосфора и взвешивают или производят спектрофотометрическое определение суспензии инсулина.

Масса инсулина за вычетом массы добавленного для затравки фибриллярного инсулина соответствует содержанию инсулина в испытуемом растворе активностью 24 и. е. в 1 мг.

При определении спектрофотометрическим методом небольших количеств инсулина получают более точные результаты, чем при гравиметрическом определении.

О б ъ е к т и с с л е д о в а н и я : свежая или замороженная поджелудочная железа крупного рогатого скота или свиней.

Материалы, реактивы, оборудование: 1 весы технические; подкисленный этиловый спирт; бумажный фильтр; концентрированная азотная кислота; раствор гидроксида натрия с массовой долей 10 %; раствор с массовой долей сульфата меди 1 %; реактив Фоля; реактив Миллона. 2. растворы с объемной долей этилового спирта 63, 80, 95 %; серная кислота; вибрационный аппарат; марля; центрифуга лабораторная; центрифужные стаканы; кристаллический инсулин с активностью 24 и. е.; стеклянные палочки; стеклянный капилляр; резиновая трубка; сосуд, соединенный с водоструйным насосом; растворы соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 и 1 моль/дм^3; метиловый спирт; спектрофотометр; шприц; ампула из молибденового стекла; гомогенизатор; термос; сухой лед.

Подготовка проб

1. Свежую или замороженную поджелудочную железу тщательно измельчают и готовят экстракт путем смешивания с подкисленным этиловым спиртом на холоде в соотношении 1 : 10 в течение 10 мин. Для проведения качественных реакций на инсулин используют фильтрованный экстракт поджелудочный железы.

2. Для количественного анализа инсулина 200 г измельченной поджелудочной железы заливают раствором этилового спирта с

объемной долей 80 %, подкисленным серной кислотой до pH 2, в соотношении 1 : 2, смесь перемешивают и экстрагируют в течение 3 ч на вибрационном аппарате, контролируя pH через каждый час экстракции.

Полученную массу колируют через два слоя марли, осадок отжимают. Раствор тотчас помещают в центрифужные стаканы вместимостью 200 $см^3$ и центрифугируют в течение 30 мин при 42–50 $с^{-1}$. Если центрифугат недостаточно прозрачен, его центрифугируют вторично.

Ход работы

1. Качественные реакции на инсулин.

Для проведения р е а к ц и и Г е л л е р а к 1 $см^3$ концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки приливают равный объем раствора инсулина. Пробирку наклоняют под углом 45° так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей фиксируют образование белого аморфного осадка в виде небольшого кольца.

Для проведения б и у р е т о в о й р е а к ц и и к 1 $см^3$ раствора инсулина добавляют 0,5 $см^3$ раствора гидроксида натрия с массовой долей 10 % и 0,1 $см^3$ раствора сульфата меди с массовой долей 1 %. Фиксируют изменение окраски.

Для проведения р е а к ц и и Ф о л я к 0,5 $см^3$ раствора инсулина добавляют 0,5 $см^3$ реактива Фоля и кипятят смесь. Через 1–2 мин термической обработки фиксируют появление бурого или черного осадка сернистого свинца.

Для проведения р е а к ц и и М и л л о н а к 1 $см^3$ раствора инсулина добавляют 2–3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Фиксируют красное окрашивание раствора белка или появление белого осадка белка, который при нагревании приобретает красную окраску.

Оформление результатов

Наблюдения за проведением качественных реакций на инсулин студенты аккуратно и точно фиксируют в тетради (описывают условия и эффект реакций), формулируют выводы. Результаты исследований рекомендуется оформить в таблице вида:

Название и механизм качественной реакции	Употребляемые реактивы, условия реакций	Эффект реакций

2. Количественное определение инсулина.

После окончания центрифугирования раствор сливают, измеряют его объем и переносят 150 $см^3$ в центрифужный стакан, в который добавляют 2,2 $см^3$ стандартного раствора фибриллярного инсулина, содержащего 4 мг инсулина активностью 24 и. с. Раствор тщательно перемешивают стеклянной палочкой, которую оставляют в центрифужном стакане, и помещают на 24 ч в термостат с температурой 48 °С. Затем образовавшийся осадок центрифугируют в течение 45 мин (при 16 $с^{-1}$ – 20 мин и при 3,3 $с^{-1}$ – 25 мин).

Прозрачный раствор из центрифужного стакана осторожно, не захватывая осадка, отбирают стеклянным капилляром, соединенным резиновой трубкой с сосудом, в котором водоструйным насосом создан небольшой вакуум.

Полученный осадок инсулина для освобождения от балластных белков промывают с последующим центрифугированием четырьмя растворами: первый – смесь 99 $см^3$ раствора с объемной долей этилового спирта 63 %, 1 $см^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/$дм^3$ и 1 г хлорида аммония (3 раза по 5 $см^3$); второй – смесь 99 $см^3$ раствора с объемной долей этилового спирта 65 %, и 1 $см^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/$дм^3$ (1 раз 5 $см^3$); третий – абсолютный ацетон (2 раза по 5 $см^3$); четвертый – 100 $см^3$ метилового спирта и 1 $см^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/$дм^3$ (2 раза по 5 $см^3$).

Промывают осадок в центрифужных пробирках вместимостью 15–20 $см^3$. Для этого осадок из центрифужного стакана после тщательного перемешивания стеклянной палочкой с 5 $см^3$ промывной смеси (первый раствор) количественно переносят в центрифужную пробирку. Центрифужный стакан с палочкой смывают 5 $см^3$ промывного раствора и используют этот раствор для промывки осадка в центрифужной пробирке после центрифугирования и отбора прозрачной надосадочной жидкости. Осадок промывают всеми четырьмя растворами, внимательно следя за сохранностью осадка и полнотой его переноса из центрифужного стакана. При промывке

растворами центрифугирование проводят в течение 7–8 мин при $25c^{-1}$.

Для спектрофотометрических измерений полученный осадок после последней промывки подкисленным метиловым спиртом центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость и тщательно перемешивают с 5 $см^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 моль/$дм^3$, содержащей 0,1 % хлорида аммония.

Оптическую плотность полученной суспензии измеряют в ультрафиолетовой области спектра. Спектрофотометрические измерения суспензии производят на спектрофотометре при длине волны 275 нм по отношению к растворителю (раствор соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 моль/$дм^3$ с 0,1 % хлористого аммония), толщина слоя 0,2 мм (кювета с вкладышем). По оптической плотности определяют с помощью калибровочного графика содержание инсулина и затем производят расчет на 100 г поджелудочной железы.

Оформление результатов

Строят калибровочный график по величинам оптической плотности суспензий, содержащих известное количество фибриллярного инсулина; фиксируют результаты количественного определения инсулина в экстрактах поджелудочной железы крупного рогатого скота, свиней в мг на 100 г сырой ткани из расчета активности инсулина 24 и. е. в 1 мг; самостоятельно формулируют заключение по работе с учетом полученных данных по качественным реакциям на инсулин.

Отчет о работе

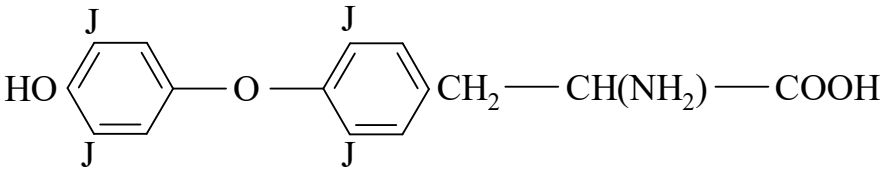
1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И НАДПОЧЕЧНИКОВ

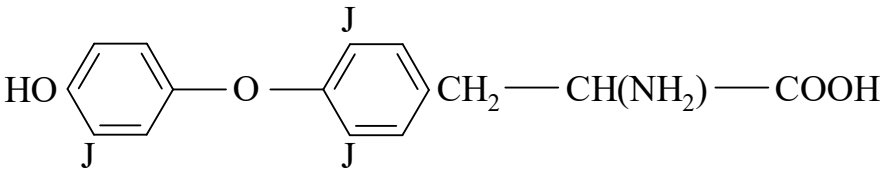
Цель и задачи работы: приобрести практический навык в анализе тиреоидина и адреналина. В задачи работы входит проведение качественных реакций на тиреоидин и адреналин; количественное определение адреналина в исследуемых образцах желез.

Методические указания

Гормоны щитовидной железы представляют собой йодированные производные аминокислоты тирозина. Йод поступает в организм с водой. В ткани железы он окисляется, принимает форму молекулярного йода и присоединяется к тирозиновому кольцу, образуя монойодтирозин. Затем в результате полимеризации йодтирозина образуются гормоны щитовидной железы – тироксин и трийодтиронин:



тироксин



трийодтироксин

Происходят эти процессы в молекулах тиреоглобулина, содержащегося в дольках железы в составе коллоида. Более 90 % органически связанного йода организма выделяется в виде тироксина.

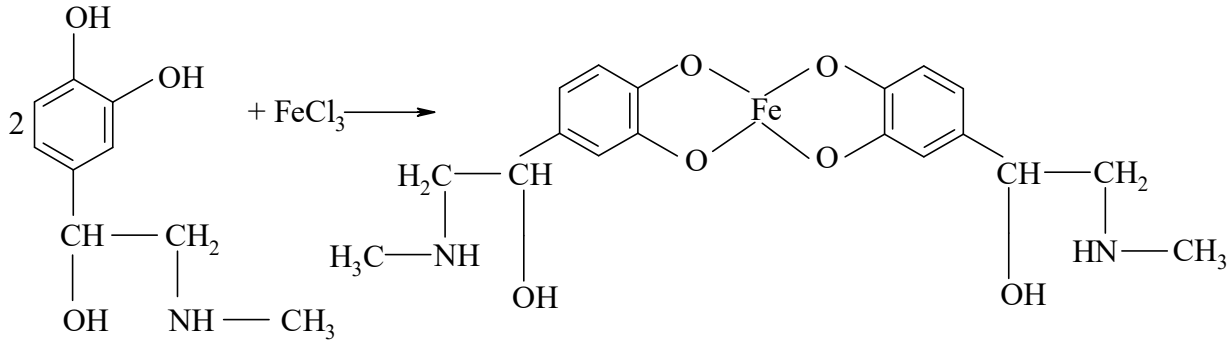
Гормоны щитовидной железы являются йодсодержащими соединениями. При их разрушении образуется йодид калия, который окисляется йодатом калия в кислой среде с образованием молекулярного йода

$$5KJ + KJO_3 + 6HCl \rightarrow 3J_2 + 6KCl + 3H_2O.$$

Результатом реакции йода с крахмалом является соединение синего цвета.

Адреналин – гормон, синтезируемый в мозговом веществе надпочечных желез, по химической структуре является амином-1-(3,4-диоксифенил)-2-метиламиноэтанолом (производным пирокатехина):

При добавлении к раствору адреналина хлорида железа (III) жидкость окрашивается в изумрудно-зеленый цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа:



Адреналин обладает слабощелочной реакцией, легко окисляется на воздухе с образованием аденохрома, вследствие чего раствор окрашивается в красный цвет.

При взаимодействии диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

В кислой среде с йодноватокислым калием адреналин образует соединение красно-фиолетового цвета.

Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, при добавлении щелочи дает флюоресцирующие продукты.

Количественное определение адреналина основано на колориметрическом определении интенсивности синего окрашивания, возникающего при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина.

Входящие в него соли при взаимодействии с адреналином восстанавливаются с образованием более низких окислов металлов, комплексы которых окрашиваются в синий цвет.

Объекты исследования: свежая или высушенная ткань щитовидной железы; свежие, замороженные или высушенные надпочечники крупного рогатого скота или свиней, препараты гормонов (медицинские): тиреоидин, адреналин.

Материалы, реактивы оборудование: раствор NaOH с массовой долей 10 %; раствор H_2SO_4 с массовой долей 10 %; раствор крахмала с массовой долей 1 %; раствор KIO_3 с массовой долей 2 %; раствор $FeCl_3$с массовой долей 1 %; раствор адреналина с массовой долей 1 %; раствор сульфаниловой кислоты с массовой долей 1 %; раствор нитрита натрия с массовой долей 5 %; раствор Na_2SO_3 с массовой долей 10 %; раствор адреналина (1 : 1000); лакмус; фарфоровая ступка с пестиком; газовая горелка; пробирки; пипетки; колба; капельница. Раствор адреналина (содержимое ампулы растворяют в 100 $см^3$ воды); раствор уксусной или ортофосфорной кислоты с массовой долей 10 %; флюороскоп; пипетки глазные; стандартный раствор адреналина (в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ отмеривают 1 $см^3$ раствора адреналина (1 : 1000) и доводят до метки водой – 1 $см^3$ такого раствора содержит 0,04 мг адреналина), свежеприготовленный раствор Na_2SO_3 с массовой долей 10 %; реактив Фолина; штатив с пробирками; центрифуга; бумажные фильтры.

Подготовка проб

Щитовидные железы убойных животных измельчают и высушивают при 70…80 °С.

Надпочечники крупного рогатого скота или свиней измельчают и экстрагируют адреналин дистиллированной водой, подкисленной лимонной или щавелевой кислотой из расчета: на 1 кг надпочечников 1,5 $дм^3$ дистиллированной воды и 9–10 г кислоты. После 2 ч экстракции массу подогревают до 90…95 °С для коагуляции белков, которые отделяют фильтрованием или центрифугированием. Фильтрат или надосадочную жидкость используют для качественного и количественного определения адреналина.

Ход работы

1. Определение тиреоидина по качественной реакции с йодидом калия.

В фарфоровой ступке тщательно растирают 100–200 мг измельченной и высушенной ткани щитовидной железы, переносят в колбу для гидролиза, добавляют 5 $см^3$ раствора NaOH и 5 $см^3$ воды. Кипятят на асбестовой сетке в течение 10–15 мин. К 3 $см^3$ охлажденного гидролизата прибавляют раствор серной кислоты до кислой реакции на лакмус. После подкисления приливают 5 капель раствора крахмала и 1 $см^3$ раствора KIO_3. Выделяющийся йод дает синее окрашивание с крахмалом.

Оформление результатов

Этапы проведения и условия развития цветной реакции фиксируют в тетради, самостоятельно делая соответствующие выводы.

2. Определение адреналина надпочечников.

Качественные реакции

Для проведения реакции с хлоридом железа (III) в пробирку вносят 1 $см^3$ экстракта адреналина, прибавляют 1 каплю раствора $FeCl_3$ с массовой долей 1 % и перемешивают. Наблюдают появление изумрудно-зеленой окраски, затем добавляют 1 каплю раствора NaOH с массовой долей 10 %, фиксируют появление вишнево-красного окрашивания.

Для проведения реакции с диазореактивом к 1 $см^3$ раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 1 $см^3$ раствора нитрита натрия с массовой долей 5 % (смесь диазореактива), 1,5 $см^3$ экстракта адреналина и 1 $см^3$ раствора Na_2CO_3 с массовой долей 10 %. Смесь перемешивают, наблюдают окрашивание раствора в красный цвет.

Для проведения реакции с йодатом калия к 0,5 $см^3$ экстракта адреналина прибавляют 1 $см^3$ раствора KJO_3 с массовой долей 10 %, 10 капель раствора уксусной или ортофосфорной кислоты и смесь подогревают до температуры 60…65 °С. Фиксируют появление интенсивного красно-фиолетового окрашивания.

Для наблюдения флюоресценции продуктов окисления адреналинак 10 каплям дистиллированной воды добавляют 6 капель раствора гидроксида натрия с массовой долей 10 % и 6 капель экстракта адреналина. Поместив пробирку перед

включенным флюороскопом, наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина.

Количественное определение адреналина по Фолину

Готовят две мерные сухие пробирки вместимостью 10 см^3. В первую вносят 1 см^3 стандартного раствора адреналина, во вторую – 1 см^3 исследуемого раствора, прибавляют по 4 см^3 свежеприготовленного раствора Na_2CO_3 с массовой долей 10 % и по 0,5 см^3 реактива Фолина. Содержимое обеих пробирок встряхивают. Жидкость постепенно окрашивается в синий цвет, достигающий наибольшей интенсивности через 3–5 мин.

Далее объем жидкости в пробирках доводят до метки раствором Na_2CO_3 с массовой долей 10 %. Содержимое пробирок перемешивают и окраску исследуемого раствора колориметрически сравнивают с окраской стандартного раствора адреналина.

Массовую концентрацию адреналина в исследуемом растворе (мг/см^3) рассчитывают по формуле

$$C = C_0 E_{on}/E_{cm}, \qquad (7)$$

где C_0 – массовая концентрация адреналина в стандартном растворе (0,04 мг/см^3);

E_{on} и E_{cm} – экстинкция исследуемого и стандартного растворов адреналина соответственно.

Оформление результатов

Наблюдения за проведением качественных реакций на адреналин, результаты количественного определения и расчета содержания адреналина в экстракте надпочечников убойных животных студенты аккуратно и точно фиксируют в тетради (описывают условия и эффект реакций), формулируют выводы о результатах изучения строения гормонов с помощью качественных реакций.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ГЛАВА 3. ВОДОСВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МЯСНОГО СЫРЬЯ

Функционально-технологические свойства фарша

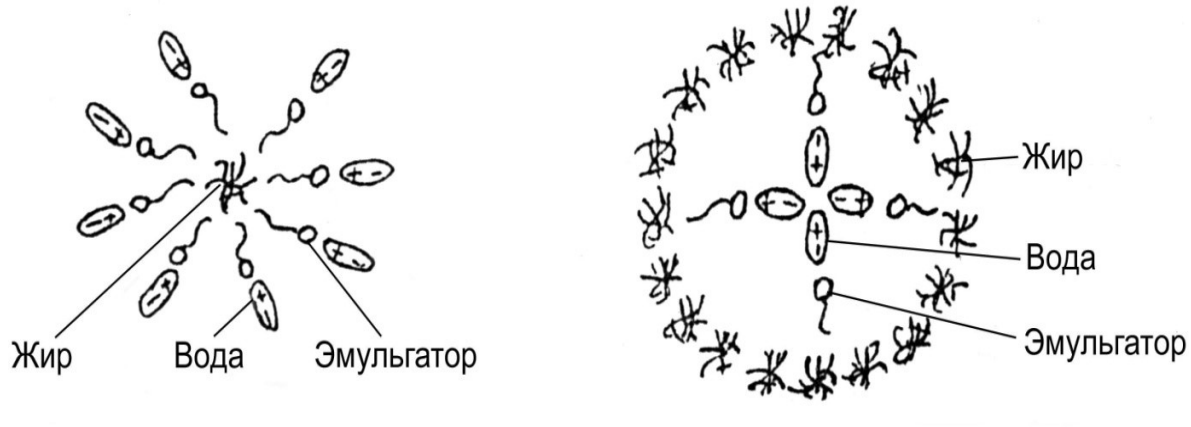
Мясное сырье многокомпонентно, вариабельно по составу и свойствам, что приводит к значительным колебаниям в качестве готовой продукции. В связи с этим особенно важное значение приобретает информация о функционально-технологических свойствах различных видов основного сырья и его компонентов, влиянии вспомогательных материалов и внешних факторов на характер их изменения.

Под функционально-технологическими свойствами (ФТС) мясного сырья понимают совокупность показателей, характеризующих уровни эмульгирующей, водосвязывающей, жиро-, водопоглощающей и гелеобразующей способностей, структурно-механические свойства (липкость, вязкость, пластичность и т. д.), сенсорные характеристики (цвет, вкус, запах), величину выхода и потерь при термообработке различных видов сырья и мясных систем. Перечисленные показатели имеют приоритетное значение при определении степени приемлемости мяса для производства пищевых продуктов.

Под функциональными свойствами изолированных белков принято понимать широкий комплекс физико-химических характеристик, определяющих их поведение при переработке и хранении, обеспечивающих желаемую структуру, технологические и потребительские свойства готовых продуктов.

Физическая структура и свойства не подвергнутого термической обработке мясного фарша близки к классическим эмульсиям.

В классическом определении под эмульсией понимают дисперсные системы с жидкой дисперсионной средой и жидкой дисперсной фазой, диспергированные в коллоидном состоянии. Жир – неполярное вещество и плохо (0,5 %) растворимо в воде. Однако при определенных условиях (наличие эмульгаторов и стабилизаторов, высокие температуры, ультразвуковые и импульсные воздействия) в системах жир – вода могут образовываться водо-жировые эмульсии прямого (жир в воде) и обратного (вода в жире) типа (рисунок 2).



а б

Рисунок 2 – Типы водо-жировых эмульсий:
а – прямая; б – обратная

Стойкость эмульсий во многом зависит от наличия в системе эмульгаторов – веществ, имеющих в составе полярные и неполярные группы.

В мясной эмульсии, образуемой в результате интенсивного механического измельчения тканей, дисперсная система состоит из дисперсной фазы – гидратированных белковых мицелл и жировых частиц различных размеров и из дисперсионной среды-раствора белков и низкомолекулярных веществ. В мясной эмульсии белок и вода образуют матрицу, которая окружает жир, т. е. колбасный фарш – эмульсия жира в воде, при этом солерастворимые белки являются эмульгаторами и стабилизаторами эмульсии (рисунок 3). По убыванию величины эмульгирующей способности (ЭС) белки мышечных волокон располагаются в последовательности: актин (без NaCl), миозин, актомиозин, саркоплазматические белки, актин в растворе соли молярной концентрацией 0,3 моль/дм^3.

Подобного рода мясные эмульсии относят к коагуляционным структурам, частицы которых связаны силами межмолекулярного взаимодействия в единую пространственную сетку (каркас). Сопоставление ЭС различных высокомолекулярных веществ показывает, что во всех случаях они стабилизируют эмульсии, образуя трехмерные сетчатые структуры с близкими геометрическими свойствами. Стабилизация эмульсий, обусловленная особыми структурно-механическими свойствами адсорбционных межфазных слоев, может

привести к повышению устойчивости этих дисперсных систем вплоть до полного фиксирования. Такая стабилизация носит универсальный характер и необходима при получении высокоустойчивых, особенно концентрированных эмульсий.

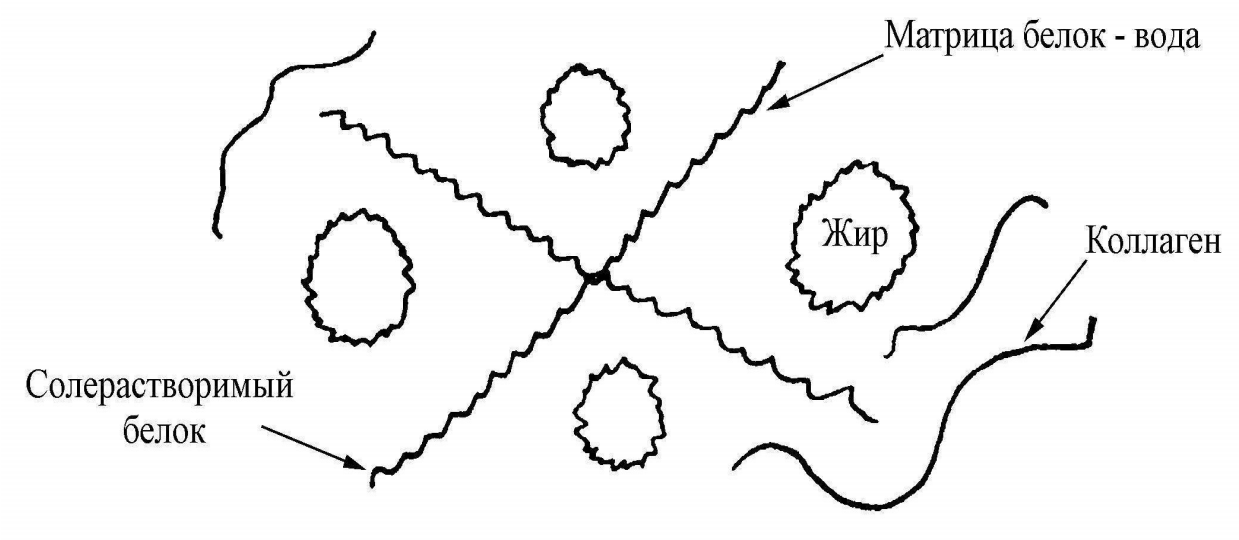


Рисунок 3 – Схематическое изображение мясной эмульсии

При технологической обработке мясного сырья со свойствами белков связано взаимодействие белок – белок (гелеобразование); белок – вода (набухание, водосвязывающая способность, растворимость); белок – липиды (жиропоглощающая и жироудерживающая способности), а также поверхностно-активные свойства – образование и стабилизация пен и эмульсий.

Мясные фарши – сложная гетерогенная система, функциональные свойства которой зависят от соотношения тканей, содержания в них специфических белков, жиров, воды, морфологических компонентов.

В составе мяса мышечная ткань оказывает значительное влияние на ФТС, так как состоит из комплекса белков, имеющих структурные отличия. В аспекте функциональных свойств при получении мясопродуктов совокупность мышечных белков ответственна за эффективность образования мясных эмульсий. Количественное содержание белка в системе, его качественный состав, условия среды предопределяют степень стабильности получаемых мясных систем,

влияют на уровень водосвязывающей, жиропоглощающей и эмульгирующей способности, структурно-механические и органолептические характеристики.

Преобладающий количественно в мышечной ткани (54–60 %) и наиболее важный функциональный белок – миозин. Его молекулы имеют выраженную ферментативную активность, легко взаимодействуют между собой и актином, обладают высокой водосвязывающей, гелеобразующей и эмульгирующей способностью.

На характер взаимодействия в системе «белок – вода» оказывают влияние такие факторы, как растворимость белковых систем, концентрация, вид, состав белка, степень нарушения нативной конформации, глубина денатурационных превращений, pH системы, наличие и концентрация солей в системе. Знание и направленное применение особенностей связывания влаги различным белоксодержащим сырьем позволяет прогнозировать и регулировать выход продукта, уровень потерь влаги при термообработке, органолептические характеристики и т. д.

Влагоудерживающая способность (ВУС), как и растворимость, одновременно зависит от степени взаимодействий как белков с водой, так и белка с белком, и поэтому от конформации и степени денатурации белка. В связи с этим, тепловая обработка оказывает сильное влияние на влагоудерживающую способность белков, что, в свою очередь, сказывается на массовом выходе готовых изделий.

В реальных многокомпонентных мясных системах поведение белка как основного стабилизирующего компонента рецептуры рассматривают во взаимосвязи как с другими компонентами (жир, вода, минеральные вещества, морфологические элементы), так и с изменяющимися в процессе технологической обработки сырья условиями среды.

При изготовлении вареных колбас, сосисок, сарделек, мясных хлебов для направленного регулирования ФТС мясных фаршевых систем используют, кроме поваренной соли, пищевые фосфаты – смеси различных солей фосфорной кислоты в количестве 0,3–0,4 % к массе фарша. Фосфаты действуют как синергисты поваренной соли, вызывая изменение величины pH среды, повышая ионную силу растворов и, связывая ионы кальция в системе актомизинового

комплекса, обеспечивают интенсивное набухание мышечных белков, увеличивают уровень водосвязывающей, влагоудерживающей и эмульгирующей способности.

Особенно эффективно использование фосфатов при переработке размороженного и тощего мяса, сырья с признаками PSE. В последние годы в связи с увеличением объемов мясного сырья с нарушениями нормального хода автолиза возникла необходимость расширения диапазона pH фосфатных препаратов, используемых в отечественной промышленности, с 6,9–7,0 до 9,0.

Экспериментально установлено, что вареные колбасы имеют в среднем приемлемое качество и удовлетворительную органолептическую оценку при устойчивости фаршевой эмульсии не ниже 85 %, влагоудерживающей способности – приблизительно 85 % общего содержания влаги в фарше, или около 90–92 % связанной влаги в сыром фарше и жироудерживающей способности – на уровне 95 % содержания жира в фарше.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение функционально-технологическим свойствам фарша.
2. Дайте определение мясной эмульсии.
3. Какие факторы оказывают воздействие в системе «белок – вода»?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАГОСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ (ВСС)

Цель и задачи работы: приобрести практический навык в определении способности мяса и мясного сырья связывать воду. В задачи работы входит подготовка модельного мясного фарша и определение способности связывать воду методами прессования и центрифугирования.

Методические указания

На практике чаще всего ВСС определяют с помощью прессования или центрифугирования.

Метод прессования основан на выделении воды испытуемым образцом при легком его прессовании, сорбции выделяющейся воды фильтровальной бумагой и определении количества отделившейся влаги по площади пятна, оставляемого ею на фильтровальной бумаге. Достоверность результатов обеспечивается трехкратной повторностью определений.

Метод центрифугирования основан на выделении под действием центробежной силы из исследуемого объекта, находящегося в фиксированном положении, жидкой фазы, количество которой зависит от степени взаимодействия влаги с «каркасной фазой» объекта. Метод условен. Достоверность результатов может быть обеспечена при трех-четырехкратной повторности определений.

Рекомендуется составить модельные композиции фарша из различных видов сырья по заданию преподавателя.

Объекты исследования: образцы мышечной ткани убойных животных (птицы) разных видов и сортов. В качестве объектов сравнения рекомендуется использовать образцы имеющих технологическое значение жировой, соединительной ткани с различных анатомических участков туши животных, вторичного мясного сырья (субпродукты II категории, мясо механической дообвалки и т. д.).

Материалы, реактивы, оборудование: груз массой 1 кг; планиметр; полиэтиленовые пробирки; центрифуга лабораторная; фильтровальная бумага; стеклянные палочки; стеклянные (или плексигласовые) пластинки.

Подготовка проб

Пробы мышечной ткани животных разных видов и сортов массой по 200–250 г отбирают на участке обвалки и жиловки мяса колбасного цеха или жилуют в соответствии с нормируемыми показателями массового содержания соединительной ткани и жира.

При жиловке говядину любой упитанности разделяют на три сорта в зависимости от массовой доли соединительной ткани и жира. К высшему сорту относят мышечную ткань без жира и соединительной ткани; к I сорту – мышечную ткань, в которой допускается наличие соединительной ткани в виде пленок не более 6 % к массе мяса; ко II сорту – мышечную ткань, содержащую до 20 % соединительной ткани и жира.

При жиловке свинину разделяют в зависимости от массового содержания жировой ткани на три сорта: нежирную, содержащую не более 10 % жировой ткани; полужирную – 30–50 % жировой ткани и жирную – более 50 % жировой ткани.

Пробы обработанных субпродуктов I и II категории массой по 50–100 г отбирают в субпродуктовом цехе или на соответствующих участках цеха первичной переработки скота.

Жилованную говядину, свинину, субпродукты I и II категории тщательно измельчают на волчке или мясорубке с диаметром отверстий решетки 2–3 мм; гомогенизаторе. Замороженное мясо механической обвалки (или дообвалки) предварительно размораживают.

Ход работы

1. При определении ВСС методом прессования навеску мясного фарша (0,3 г) взвешивают на торзионных весах на кружке из полиэтилена диаметром 15–20 мм (диаметр кружка должен быть равным диаметру чашки весов), после чего ее переносят на беззольный фильтр, помещенный на стеклянную или плексигласовую пластинку так, чтобы навеска оказалась под кружком.

Сверху навеску накрывают такой же пластинкой, как и нижняя, устанавливают на нее груз массой 1 кг и выдерживают 10 мин. После этого фильтр с навеской освобождают от груза и нижней пластинки, а затем карандашом очерчивают контур пятна вокруг спрессованного мяса.

Внешний контур вырисовывается при высыхании фильтровальной бумаги на воздухе. Площади пятен, образованных спрессованным мясом и адсорбированной влагой, измеряют планиметром.

Размер влажного пятна (внешнего) вычисляют по разности между общей площадью пятна и площадью пятна, образованного мясом. Экспериментально установлено, что 1 $см^2$ площади влажного пятна фильтра соответствует 8,4 мг воды.

Массовую долю связанной влаги по методу прессования вычисляют по формулам:

$$x_1 = (А - 8{,}4Б)\ 100/m_0, \qquad (8)$$

$$x_2 = (А - 8{,}4Б)\ 100/А, \qquad (9)$$

где x_1 – массовая доля связанной влаги, % к массе мяса;

x_2 – то же, % к общей влаге;

А – общая масса влаги в навеске, мг;

Б – площадь влажного пятна, мг;

m_0 – масса навески мяса, мг.

2. При определении ВСС методом центрифугирования образцы мяса массой около 4 г помещают в полиэтиленовую пробирку с перфорированным вкладышем, укрепленным таким образом, чтобы был обеспечен необходимый зазор для стекания жидкости. Пробы центрифугируют 20 мин при 100 $с^{-1}$. После центрифугирования пробы взвешивают. К массе пробы после центрифугирования прибавляют массу веществ, содержащихся в отделенной центрифугированием жидкости. Массу веществ, содержащихся в отделенной центрифугированием жидкости, определяют высушиванием при 105 °С до постоянной массы. Для расчета количества связанной влаги необходимо располагать данными об общем содержании влаги в объекте.

Массовую долю связанной влаги по методу центрифугирования (х, %) рассчитывают по формуле:

$$x = (m_1 + m_3 - m_2)\ 100/m_0, \qquad (10)$$

где m_1 – масса навески после центрифугирования, г;

m_3 – масса сухого остатка выделившейся жидкости, г;

m_2 – масса сухого остатка в навеске, г;

m_0 – масса навески до центрифугирования, г.

Оформление результатов

Экспериментальные данные рекомендуется оформить в таблице вида:

Наименование образцов	Состав модельного фарша	ВСС	
		по методу прессования	по методу центрифугирования

Сравнивая компонентный состав мясных фаршей, делают выводы и самостоятельно формулируют заключение по работе.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАГОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ (ВУС), ЖИРОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ (ЖУС), ЭМУЛЬГИРУЮЩЕЙ (ЭС) СПОСОБНОСТИ, СТАБИЛЬНОСТИ (СЭ) ФАРШЕВОЙ ЭМУЛЬСИИ

Цель и задачи работы: приобрести практический навык определения ВСС, ЖУС, ЭС и СЭ в мясных системах. В задачи работы входит подготовка модельных мясных фаршей и анализ их ВУС, ЖУС, ЭС и СЭ гравиметрическими и рефрактометрическими методами.

Методические указания

Оценка влагоудерживающей способности основана на определении разности между массовым содержанием влаги в фарше и количеством влаги, отделившейся в процессе термической обработки.

Жироудерживающая способность мясного фарша определяется как разность между массовым содержанием жира в фарше и количеством жира, отделившимся в процессе термической обработки.

Отношение объема эмульгированного масла к общему его объему в системе называют эмульгирующей способностью (ЭС). При таком определении ЭС в нее включается и понятие стабильности эмульсии, проявляющейся за промежуток времени от окончания эмульгирования до момента измерения при фиксированных условиях проведения эксперимента.

Устойчивость фарша характеризует связанное фаршевой эмульсией количество влаги и жира и определяется отношением массы выделившегося в процессе тепловой обработки бульона и жира к массе фарша, взятого на исследование.

Возможность последовательного определения в одной навеске нескольких функциональных показателей (Р. М. Салаватулина и др.) позволяет снизить погрешность за счет неоднородности химического состава и лабильности свойств сырья. При этом определение и расчет устойчивости фаршевой эмульсии, ВУС и ЖУС по массе фактически связанных компонентов фаршевой эмульсии производится в условиях, максимально приближенных к производственным. Методика характерна простотой практической реализации, высокой воспроизводимостью результатов.

Объекты исследования: мясные фарши, составленные из различного мясного и немясного сырья в произвольных пропорциях.

Материалы, реактивы, оборудование: молочный жиромер; стеклянные палочки; бюкса; сушильный шкаф; бумажный фильтр; фарфоровая ступка; прокаленный песок; α-монобромнафталин; складчатый бумажный фильтр; рефрактометр; консервные банки; водяные бани.

Подготовка проб

Осуществляется в соответствии с рекомендациями к лабораторной работе № 1.

Ход работы

1. При определении влагоудерживающей способности (ВУС) навеску тщательно измельченного мяса массой 4–6 г наносят равномерно стеклянной палочкой на внутреннюю поверхность широкой части молочного жиромера. Жиромер плотно закрывают пробкой и помещают в водяную баню при температуре кипения узкой частью вниз на 15 мин, после этого определяют массу выделившейся влаги по числу делений на шкале жиромера.

Влагоудерживающая способность мяса (ВУС, %)

$$ВУС = В – ВВС, \quad (11)$$

влаговыделяющая способность (ВВС, %)

$$ВВС = a \cdot n \cdot m^{-1} \cdot 100, \quad (12)$$

где В – общая массовая доля влаги в навеске, %;

a – цена деления жиромера; а = 0,01 см^3;

n – число делений;

m – масса навески, г.

2. При определении жироудерживающей способности (ЖУС) предварительно рассчитывают ВВС по п. 1, находят массу мяса,

оставшегося в жиромере, с точностью ±0,0001 г. Мясо помещают в бюкс и высушивают до постоянной массы при температуре 423 К в течение 1,5 ч. После высушивания берут навеску массой (2,0000 ± 0,0002) г, помещают в фарфоровую ступку, куда добавляют 2,5 г (1,6 см^3) мелкого прокаленного песка и 6 г (4,3 см^3) α-монобромнафталина. Содержимое ступки тщательно растирают 4 мин и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

3–4 капли испытуемого раствора равномерно наносят стеклянной палочкой на нижнюю призму рефрактометра. Призмы закрывают, скрепляют винтом. Луч света направляют при помощи зеркала на призму рефрактометра, устанавливая зрительную трубу так, чтобы были отчетливо видны пересекающиеся нити (алиада). Алиаду передвигают до тех пор, пока граница между освещенной и темной частями не совпадет с точкой пересечения нитей, и отсчитывают показатель преломления. Одновременно определяют показатель преломления монобромнафталина.

Определения повторяют несколько раз, используя при расчете средние данные.

Жироудерживающая способность мяса (ЖУС, %):

$$\text{ЖУС} = g_1 \cdot g_2^{-1} \cdot 100, \qquad (13)$$

где g_1 – массовая доля жира в навеске после термообработки, %;

g_2 – то же до термообработки, %.

Массовая доля жира в навеске (g, %)

$$g = [10^4 \cdot \alpha \cdot (n_1 - n_2) \cdot m_1]/m_2, \qquad (14)$$

где α – коэффициент, характеризующий такое содержание жира в растворителе, которое изменяет показатель преломления на 0,0001 %;

n_1 – показатель преломления чистого растворителя;

n_2 – показатель преломления испытуемого раствора;

m_1 – масса 4,3 см^3 α-монобромнафталина, г;

m_2 – масса навески, г.

Коэффициент α устанавливают опытным путем при сопоставлении результатов определения массовой доли жира методом Сокслета и рефрактометрическим.

$$\alpha = c_1 / (10^4 \cdot \Delta n), \quad (15)$$

$$c_1 = (c\ 100)/m_0, \quad (16)$$

где c_1 – массовая доля жира в фильтрате, %;

Δn – разность между показателями преломления чистого растворителя и испытуемого фильтрата;

c – содержание жира в навеске, определенное в аппарате Сокслета, г;

m_0 – масса навески растворителя, г.

Коэффициент α для некоторых продуктов приведен в таблице 4.

Таблица 4 – Коэффициент α

Продукт	Коэффициент α
Мясной порошок	0,0470
Сосиски:	
Свиные	0,0375
Русские	0,0369
Колбаса ливерная	0,0394

3. При определении эмульгирующей способности навеску измельченного мяса массой 7 г суспензируют в 100 см^3 воды в гомогенизаторе (или миксере) при 66,6 с$^{-1}$ в течение 60 с. Затем добавляют 100 см^3 рафинированного подсолнечного масла и смесь эмульгируют в гомогенизаторе или миксере при 1500 с$^{-1}$ в течение 5 мин. После этого эмульсию разливают в 4 калиброванные центрифужные пробирки вместимостью по 50 см^3 и центрифугируют при 500 с$^{-1}$ в течение 10 мин. Далее определяют объем эмульгированного масла.

Эмульгирующая способность (ЭС, %):

$$ЭС = \frac{V1}{V} \cdot 100, \quad (17)$$

где V_1 – объем эмульгированного масла, см^3;

V – общий объем масла, см^3.

Стабильность эмульсии (СЭ) определяют путем нагревания при температуре 353 К в течение 30 мин и охлаждения водой в течение 15 мин. Затем заполняют эмульсией 4 калиброванные центрифужные пробирки вместимостью по 50 см^3 и центрифугируют при 500 с$^{-1}$ в течение 5 мин. Далее определяют объем эмульгированного слоя.

Стабильность эмульсии (СЭ, %) рассчитывают по формуле

$$ЭС = \frac{V_1}{V_2} \cdot 100, \qquad (18)$$

где V_2 – общий объем эмульсии, см^3;

V_1 – объем эмульгированного масла, см^3.

4. При использовании метода последовательного определения ВУС, ЖУС, устойчивости фаршевой эмульсии в одной навеске (Р. М. Салаватулина и др.) образцы фарша массой 180–200 г помещают в герметично закрытые консервные банки № 3, взвешивают и подвергают тепловой обработке при режимах, соответствующих производственным (варка в водяной бане при температуре 78…80 °С в течение 1 ч, охлаждение в проточной воде до температуры 12…15 °С).

Консервные банки вскрывают, выделившийся бульон и скопления жира переносят в предварительно взвешенные алюминиевые бюксы. После удаления бульона и жира фарш промокают фильтровальной бумагой и взвешивают.

Бюксы с бульоном помещают в сушильный шкаф и сушат до постоянной массы при 103…105 °С. Определяют массовую долю влаги, выделившейся при тепловой обработке фарша, и влагоудерживающую способность фарша.

Из бюкс с остатками бульона и жира экстрагируют жир 10–15 см^3 растворителя (смесь хлороформа с этиловым спиртом в соотношении 1 : 2). Экстрагирование жира проводят в течение 3–4 мин трех-четырехкратной повторностью. Установив массовую долю оставшегося жира после тепловой обработки фарша, рассчитывают жироудерживающую способность.

Устойчивость фаршевой эмульсии (УЭ, % к массе фарша):

$$ЭС = \frac{V1}{V} \cdot 100, \quad (19)$$

$$УЭ = \frac{С}{А} \cdot 100, \quad (20)$$

$$А = Б - б, \quad (21)$$

$$Д = А - С, \quad (22)$$

где А – масса навески фарша, г;

Б – масса герметизированной консервной банки с навеской фарша, г;

б – масса консервной банки, г;

С – масса сгустка фарша после термообработки, г;

Д – масса всего отделившегося бульона с жиром, г.

Влагоудерживающая способность (ВУС, % к массе фарша)

$$ВУС = В - \frac{Дв}{МА} \cdot 100, \quad (23)$$

где В – массовая доля влаги в фарше, %;

в – масса воды в исследуемом бульоне, г;

М – масса исследуемого бульона с жиром, г.

Жироудерживающая способность фарша (ЖУС, % к массе фарша)

$$ЖУС = Ж - \frac{Дж}{МА} \cdot 100, \quad (24)$$

где Ж – массовая доля жира в фарше, % к массе;

ж – масса жира в исследуемом бульоне, г.

Оформление результатов

Экспериментальные данные для различных вариантов модельных фаршей размещают в таблице вида:

Массовая доля компонентов в составе модельного фарша, %	ВУС, %	ЖУС, %	ЭС, %	СЭ, %

По результатам определений делают выводы о технологической функциональности сырья и формулируют общее заключение по работе.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕЛЕОБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ (ГС)

Цель и задачи работы: приобрести практический навык в получении и анализе гелей (студней).

Методические указания

В коллоидной химии гелями называют твердообразные дисперсные системы, внутри которых распределена жидкость. В отечественной литературе за гелями, образованными из растворов органических высокомолекулярных соединений, установилось название студней. В соответствии с этими названиями иногда термин структурообразование заменяют на гелеобразование или студнеобразование.

Склонностью к образованию коагуляционных структур обладают асимметричные (нитевидные или лентовидные) частицы с высоким, более 100, осевым соотношением (отношение длины к ширине). Даже в небольших концентрациях они способны образовать сплошной рыхлый пространственный каркас в виде единого агрегата благодаря неравномерному распределению центров коагуляции по концам частиц. В петлях образующегося каркаса фиксируется дисперсионная среда. Такое структурообразование называется застудневанием, а образующаяся дисперсная система – лиогелем, или студнем.

Переход жидкости в лиогель сопровождается изменением структурно-механических свойств системы: возникает жесткость, обусловленная наличием в системе непрерывного каркаса, в котором цепные частицы соединены локальными связями в центрах наибольшей лиофобности.

При напряжении выше предела прочности структурный каркас деформируется в результате смещения частиц относительно друг друга и контактов между ними, что внешне выражается в течении всей системы.

Эмульсионная природа мясных фаршей обусловливает высокую концентрацию белков в адсорбционных стабилизирующих слоях. Как правило, концентрация белка достаточно высока и пре-

вышает критическую концентрацию гелеобразования. Это предопределяет возможность формирования гелевых структур в межфазных слоях и обусловливает физическую и химическую стабилизацию жира и воды в мясопродуктах из тонкоизмельченного фарша, обеспечивая тем самым качество продукта. Готовые продукты приобретают свойства гелей, в которые включены капельки жира. При этом гелеобразование включает формированние непрерывной белковой сетки, имеющей определенную степень упорядоченности.

Среди белков животных тканей основную роль в формировании структуры мясных эмульсий и последующем термотропном гелеобразовании играет миозин.

При достаточно высокой степени измельчения и под воздействием термообработки коллаген хорошо гидролизуется с образованием глютина и желатоз, которые обладают выраженной водосвязывающей и застудневающей способностью, что позволяет частично стабилизировать свойства готовых мясных изделий при использовании коллагенсодержащего сырья в виде белковых препаратов, эмульсий, гидролизатов.

Все белки плазмы крови способны образовывать гели при нагревании. Фибриноген имеет выраженную гелеобразующую способность, переходя в фибрин под воздействием внешних факторов и образуя пространственный каркас. Введение в плазму неплазменных белков, клетчатки, пектина существенно увеличивает прочность гелей.

Белки яйца обладают высокими гелеобразующими свойствами, особенно в присутствии альбуминов сыворотки крови и других компонентов.

Растительные белковые добавки в комбинированных пищевых системах проявляют свойства, аналогичные структурообразующим мышечным белкам нежирного мяса. Знание механизмов образования, способов практического получения и анализа свойств студней необходимы в технологической практике.

Работа состоит из двух этапов: получение гелей и исследование свойств.

О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я: фракция миофибриллярных белков мышечной ткани; продукт гидролиза коллагена – желатин

пищевой; плазма крови; образцы растительных белковых препаратов различной степени очистки и технологических форм на основе сои, чечевицы или других культур; агар (или агароид); пектин.

Материалы, реактивы, оборудование: солевой раствор Вебера; поваренная соль; марлевый фильтр; сахар; плитка электрическая; воронки лабораторные; вата; прибор Валента; прибор Тарр-Бейкера; ватерпас; стеклянный сосуд; прокаленный песок; грибовидная насадка; медицинский шприц; поршень; спирт этиловый; резервуар; груз (100–500 г).

Подготовка проб

1. Экстракцию миофибриллярной фракции белков проводят солевым раствором Вебера или раствором поваренной соли эквивалентной молярной концентрации. Масса образца мышечной ткани - 100 г.

2. Готовят исходный раствор образца желатина с массовой долей 10, 15 или 25 % в пересчете на обеззоленное сухое вещество (в соответствии с полученным заданием).

Массу навески желатина (X, г) для приготовления 1000 г исходного стандартного раствора с заданной массовой долей абсолютно сухого обеззоленного вещества вычисляют по формуле

$$X = m\ 1000 / [100 - (w + c)], \qquad (25)$$

где w – массовая доля влаги;

c – массовая доля золы в образце желатина, %.

Навеску, взвешенную с погрешностью не более ± 0,01 г, помещают в колбу с пришлифованной пробкой, приливают необходимый объем дистиллированной воды, плотно закрывают колбу пробкой и оставляют для набухания в течение 1–2 ч. Колбу с набухшим желатином помещают в термостат, повышая температуру от 40 до 75 °С в целях полного растворения. Для ускорения растворения колбу с содержимым периодически встряхивают. Приготовленный раствор фильтруют через два слоя марли.

3. Плазму крови получают сепарированием или центрифугированием цельной стабилизированной крови в течение 5–8 мин при частоте вращения барабана 25–42 $с^{-1}$. Плазму (надосадочная жидкость) отделяют декантацией.

4. Сухие растительные белковые препараты предварительно гидратируют в условиях: соотношение белковый препарат – вода, равное 1 : (2–2,5) для муки, 1 : 3 для концентрата, 1 : 4 для изолята, температура воды 15–25 °С, продолжительность обработки в куттере или мешалке – 1–3 мин.

5. Растворы агара готовят следующим образом: к навеске сухого агара массой 1,7 г (анфельция) или 2,5 г (фурцелларан), взвешенной с точностью ± 0,001 г, добавляют объем дистиллированной воды из расчета, чтобы общая масса раствора была 200 г, и оставляют для набухания не менее чем на 1 ч, после чего нагревают на водяной бане с обратным холодильником до полного растворения агара.

Для агара из фурцелларана готовят раствор с сахаром, добавляя в смесь после полного растворения агара 140 г сахара, и нагревание продолжают, доводя всю массу до кипения. Массу кипятят в течение 2-3 мин, затем взвешивают и нагревание продолжают до тех пор, пока масса агарно-сахарного раствора не будет доведена до 200 г.

Если раствор содержит нерастворимые примеси, его фильтруют в горячем состоянии через воронку с сухой ватой.

Ход работы

1. Получение гелей.

Для получения гелей миофибриллярных белков раствор миофибриллярных белков помещают в лабораторные стаканы и нагревают на водяной бане, визуально фиксируя температуру и время формирования геля.

Растворы желатина с различной массовой долей (0,5–5 %) помещают в соответствующую лабораторную посуду, оставляют для гелеобразования при заданной температуре из рекомендуемого температурного интервала (0…10…20…30 °С). Через каждые 20–30 мин визуально фиксируют образование геля.

Готовят смесь из плазмы крови и натурального (морковного или тыквенного) сока с мякотью при соотношении компонентов 1 : 1 по объему, оставляют для гелеобразования при температуре 16…22 °С. Каждые 20–30 мин визуально фиксируют образование геля.

Приготовленный раствор агара, агароида или агарно-сахарный раствор разливают в подготовленные сухие стаканы. Стаканы с горячим раствором агара помещают в горизонтально установленный сосуд с плоским дном (например, кристаллизатор), заполненный водой температурой 20 °С. Стаканы с агарно-сахарным раствором термостатируют при 30…60 °С. Уровень воды должен быть немного выше уровня раствора в стаканах. Стаканы с раствором выдерживают в сосуде при температуре 20 °С, поддерживая ее добавлением холодной или теплой воды. Визуально фиксируют образование геля и промежуток времени, прошедший до гелеобразования.

2. Определение физических показателей студней.

Образцы гелей для исследования готовят в пяти стаканах диаметром 4,0–4,5 см вместимостью по 100 см^3, на которые наносят метки, соответствующие объему 30 см^3, и далее используют для определения прочностных характеристик на приборе Валента (рисунок 4).

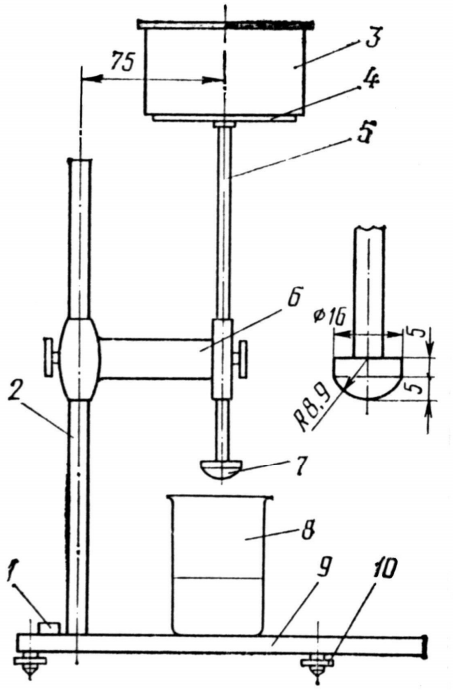


Рисунок 4 – Прибор Валента:
1 – ватерпас; 2 – штатив; 3 – сосуд для груза; 4 – площадка для сосуда;
5 – шток; 6 – передвижной кронштейн; 7 – стакан; 8 – насадка
для испытуемого студня; 9 – основание; 10 – регулировочный винт

Для определения студнеобразующей способности образцов на приборе Тарр-Бейкера формование гелей проводят в стаканах конической формы объемом по 50 см^3, температуры плавления студней – в двух пробирках для каждого образца.

Определение прочности студня на приборе Валента

Стаканы с образовавшимся студнем ставят на основании прибора Валента, горизонтально установленного при помощи ватерпаса, и на поверхность студня осторожно опускают грибообразную насадку. Поверхность, на которую давит насадка, имеет площадь 2 см^2. В сосуд, помещенный на площадку, медленно насыпают сухой промытый и прокаленный песок до тех пор, пока насадка, надавливая на студень, не прорвет его. Масса подвижной системы, состоящей из грибовидной насадки, штока, площадки и сосуда для груза, должна находиться в пределах 90–100 г. Насадка должна быть изготовлена из антикоррозионного металла с полированной шаровой поверхностью. Нагрузку следует подавать равномерно, приблизительно 10–12 г/с.

Перед опытом рекомендуется проверить равномерность подачи нагрузки. Для этого в стакан в течение 1 мин насыпают песок с принятой скоростью, затем взвешивают стакан с нагрузкой. При отклонении от рекомендуемых значений проверку повторяют, соответственно изменив скорость подачи груза (песка).

Прочность студня при измерении показателя на приборе Валента ($С_в$, г/см^2)

$$C_в = m/S, \qquad (26)$$

где m – масса всей нагрузки песка, сосуда и стержня с насадкой и площадкой, г;

S – площадь поверхности насадки; S = 2 см^2.

Определение студнеобразующей способности на приборе Тарр-Бейкера

Основой метода является определение максимальной прочности студня на разрыв. Определение проводят на приборе Тарр-Бейкера (рисунок 5), который состоит из стеклянного стандартного поршня *9*, напорного сосуда с водой *5*, буферного сосуда *3*, мано-

метра *6*, заполненного четыреххлористым углеродом, подкрашенным йодом. Шкала манометра имеет диапазон от 0 до 90 см с ценой деления 1 см. Система прибора снабжена кранами *1, 2, 4, 7* и *8*.

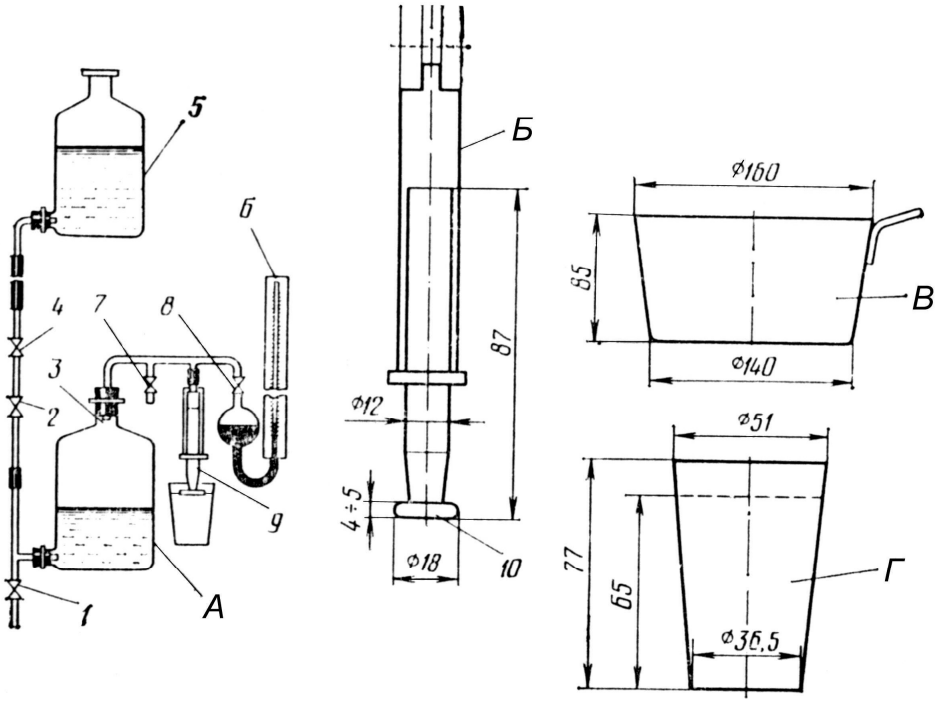


Рисунок 5 – Прибор Тарр-Бейкера:
А – измерительная часть; Б – поршень; В – чашечка; Г – стакан

В качестве стандартного поршня используют обычный медицинский шприц. Основным рабочим органом является площадка поршня *10*, размеры которой должны точно соответствовать указанным на рисунке 4. Рабочая поверхность поршня должна быть совершенно чистой. После каждого измерения поршень следует промыть спиртом и высушить. Поршень хранят погруженным в спирт и вытирают перед употреблением.

При проведении испытания предварительно регулируют скорость истечения воды из напорного резервуара краном *4* так, чтобы при полностью открытом кране *2* столб четыреххлористого углерода поднимался примерно на 40 см за 1 мин. Такое положение крана *4* при дальнейшем анализе не изменяют. Стандартный поршень обильно смазывают глицерином, чтобы на холостом ходу он свободно скользил по корпусу.

Стакан с желе устанавливают так, чтобы его центральная ось совпадала с осью поршня, который осторожно опускают на поверхность желе. Закрывают кран *7* и открывают последовательно краны *8* и *2*. В момент, когда поршень прорвет поверхность желе, кран *4* закрывают и отсчитывают высоту столба четыреххлористого углерода (в см) по разности уровней в обоих коленах манометра. Кран *2* закрывают, а кран *7* открывают и восстанавливают положение поршня для последующего определения. Кран *1* используется для слива воды.

По максимальному значению разницы уровня четыреххлористого углерода по таблице 5 находят желирующую способность (°ТБ).

Таблица 5 – Студнеобразующая способность пищевых систем, °ТБ

Высота столба CCl_4, см	Градусы студнеобразующей способности пищевых систем по Тарр-Бейкеру при десятых долях, см									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	–	–	–	83	96	107	117	125	133	142
10	149	156	162	168	175	180	186	192	197	202
20	207	212	227	221	225	229	233	237	241	246
30	250	254	258	262	265	268	272	276	80	284
40	287	290	293	296	299	302	305	308	311	314
50	318	321	324	327	329	335	338	341	344	344
60	347	350	352	354	357	360	363	365	368	370
70	372	375	378	381	383	386	388	390	392	394
80	396	398	401	404	406	408	410	412	414	417
90	419	421	424	426	428	430	431	433	436	438

Определение температуры плавления студня

Испытуемый раствор наливают в две пробирки приблизительно до половины их высоты, закрывают пробирки резиновыми пробками. Переводят находящийся в пробирках раствор или пищевую смесь в студень.

Пробирки со студнем помещают в стакан с водой температурой 20 °С и с погруженным в него термометром. Стакан помещают в водяную баню той же температуры. Баню подогревают таким образом, чтобы скорость повышения температуры воды в стакане на 1 °С не превышала 2–3 мин. Через каждые 3–5 градусов повышения температуры одну из пробирок вынимают из стакана и, наклоняя ее,

наблюдают, не расплавился ли студень. Температуру, при которой содержимое пробирки перейдет в жидкое состояние, отмечают как температуру плавления студня. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 1 °С.

Оформление результатов

1. Фиксируют продолжительность процесса гелеобразования для различных пищевых систем. По результатам испытаний строят диаграмму, иллюстрирующую зависимость скорости гелеобразования от вида и состава дисперсионной среды.

2. Результаты исследования физических свойств гелей оформляют в таблице вида:

Состав пищевых систем, характеристика дисперсной фазы и дисперсионной среды	Прочностные свойства		Температура плавления студня, °С
	Прочность студня, г/см	Желирующая способность, °ТБ	

Сопоставляют результаты, дают сравнительную оценку желирующих свойств различных белков и пищевых систем, формулируют выводы.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ МЯСА ПРИ ХОЛОДИЛЬНОЙ ОБРАБОТКЕ

Мясо и мясопродукты – традиционная и одновременно уникальная составная часть пищевых рационов. Уникальность мяса состоит в высокой энергоемкости, сбалансированности аминокислотного состава аминокислот в белках, наличии биологически активных веществ и высокой усвояемости, что в совокупности обеспечивает нормальное физическое и умственное развитие человека.

Под понятием качества пищевых продуктов подразумевают широкий спектр свойств, характеризующих пищевую и биологическую ценность, а также органолептические, структурно-механические, функционально-технологические, санитарно-гигиенические и прочие характеристики продукта, степень их выраженности.

В большинстве случаев значение этих показателей зависит в первую очередь от состава сырья, его биохимических изменений в процессе технологической обработки, внешних воздействий, а также за счет используемых аддитивов. С точки зрения качественных показателей пищевой продукт должен содержать компоненты, необходимые организму человека для нормального обмена веществ.

Современные представления о количественных и качественных потребностях человека в пищевых веществах отражены в концепциях сбалансированного и адекватного питания. Согласно первой концепции в процессе нормальной деятельности человек нуждается в определенных количествах энергии и комплексе пищевых веществ: белках, аминокислотах, углеводах, жирах, жирных кислотах, минеральных элементах, витаминах, причем многие из них являются незаменимыми, т. е. не вырабатываются в организме, но необходимы ему для жизнедеятельности. Вторая доказывает, что компоненты питания должны быть строгом соотношении, при том именно оно определяет в конечном итого усвояемость пищи и регулирует питание на уровне гомеостаза.

Человеческие потребности в пищевых веществах с учетом суммарной энергетической ценности представлены в виде формулы сбалансированного питания (таблица 6).

Таблица 6 – Формула сбалансированного питания взрослого человека

Пищевые вещества	Дневная потребность	Пищевые вещества	Дневная потребность
1	2	3	4
Вода, г	1750–2200	витамин А	–
в том числе:	–	(различные формы)	1,5–2,5
питьевая (вода,	–	каротиноиды	3–5
чай, кофе и т. д.)	800–1000	витамин Е	–
в супах	250–500	(различные формы)	10–20
в продуктах	–	витамин К	–
питания	700	(различные формы)	0,2–0,3
Белки, г	80–100	липоевая кислота	0,5
в том числе	–	инозит, г	0,5–0,1
животные	50	Углеводы, г:	400–500
Незаменимые	–	в том числе:	
аминокислоты, г:	–	крахмал	400–450
триптофан	1	моно- и дисахариды	–
лейцин	4–6	Органические кислоты	–
изолейцин	3–4	(лимонная, моло-	–
валин	3–4	чная и т. п.), г	2
треонин	2–3	Балластные	
лизин	3–5	вещества, г	25
метионин	2–4	Жиры, г	80–100
фенилаланин	2–4	в том числе:	
Заменимые		растительные	20–25
аминокислоты, г:		незаменимые	
гистидин	1,5–2	полиненасыщенные	
аргинин	5–6	жирные кислоты	2–6
цистин	2–3	холестерин	0,3–0,6
тирозин	3–4	фосфолипиды	5
аланин	3	Минеральные	–
серин	3	вещества, мг	–
глутаминовая	–	кальций	800–1000
кислота	16	фосфор	1000–1500
аспарагиновая	–	натрий	4000–6000
кислота	6	калий	2500–5000
пролин	5	хлориды	5000–7000
гликокол	3	магний	300–500
Витамины, мг:	–	железо	15
витамин С	50–70	цинк	10–15

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4
тиамин (B1)	1,2–2,0	марганец	5–10
рибофлавин (B2)	2,0–2,5	хром	0,20–0,25
ниацин (PP)	15–25	медь	2
пантотеновая	–	кобальт	0,1–0,2
кислота (B3)	5–10	молибден	0,5
витамин B6	2–3	селен	0,5
витамин B12	0,002–0,005	фториды	0,5–1,0
биотин	0,15–0,30	йодиды	0,1–0,2
холин	500–1000	Энергетическая	–
рутин (P)	25	ценность:	–
фолацин (B9)	0,2–0,46	ккал	2850
витамин D	–	кДж	11900
(различные формы)	0,0025–0,01	–	–

В связи с этим для характеристики качества и пищевой ценности продукта необходима информация о его общем химическом и элементарном составе, степени соответствия каждого компонента формуле сбалансированного питания, способности перевариваться и усваиваться организмом.

Качество

Качество сырья и мясных продуктов характеризуется сложным комплексом химических, биохимических, физико-химических, гистологических и других характеристик.

Применительно к мясоперерабатывающей промышленности конкретное технологическое содержание понятия «качество» связано с такими критериями, как органолептические свойства, пищевая ценность, гигиенические и токсикологические состояния, технологические показатели.

На основе анализа имеющихся литературных данных можно назвать следующие наиболее важные группы свойств для всех мясных объектов: органолептические характеристики, показатели биологической ценности, показатели приспособленности к хранению и

характеристики безвредности. Каждый конкретный тип мясного сырья должен иметь индивидуальный набор показателей качества. Специфической, но разной по набору свойств для сырья и полуфабрикатов, является группа технологических показателей, определяющих направление и технологию их переработки.

В то же время, как отмечалось выше, состояние продукта описывается сложным комплексом химических, биохимических, физико-химических, гистологических, реологических и других характеристик, для объективного описания всей их совокупности необходимо одновременное и взаимосвязанное использование целого ряда характеристик и методов их определения, основанных на самых различных принципах.

Необходимо отметить, что показатели, подлежащие измерению при оценке качества мясной продукции, можно объединить в три группы: показатели, поддающиеся прямой объективной оценке (содержание соли, фракционный состав и т. д.); показатели, поддающиеся косвенной объективной оценке и показатели, не поддающиеся объективной приборной оценке (товарный вид, вкус и т. д.). Для измерения последней группы существуют методы экспертной оценки, основанные на теории вероятностей и математической статистике и являющиеся достаточно точными, но трудоемкими. В то же время приборное обеспечение для объективных методов оценки первых двух групп показателей в промышленных условиях находится пока еще на недостаточном уровне.

Контроль качества продуктов питания, как правило, основан на сочетании органолептических и инструментальных (или других несенсорных) методов. В оценке качества приоритетными методами являются органолептические. По сложившимся понятиям, инструментальное исследование обеспечивает достоверность и объективность результатов. Корреляцию между органолептическими и инструментальными показателями изучают для того, чтобы обосновать применение одного или иного несенсорного метода для характеристики цвета, вкуса, запаха или консистенции продукта.

Органолептическая (сенсорная) оценка, проводимая с помощью органов чувств человека – наиболее древний и широко распространенный способ определения качества пищевых продуктов с уча-

стием дегустаторов. Органолептический метод быстро и при правильной постановке анализа объективно и надежно дает общее впечатление о качестве продуктов.

При этом необходимо использовать научно обоснованные методы отбора дегустаторов и оценки продуктов, выполнять требования, предъявляемые к помещению, освещению и другие условия проведения дегустационного анализа.

Современный уровень исследования качества продовольственных товаров немыслим без дегустационного анализа, проводимого с использованием балловых шкал.

Органолептические свойства – это свойства объектов, оцениваемые с помощью чувств человека (вкус, запах, консистенция, окраска, внешний вид и т. д.). Органолептический анализ пищевых и вкусовых продуктов проводится посредством дегустаций, т. е. исследований, осуществляемых с помощью органов чувств специалиста – дегустатора без измерительных приборов.

Показатели качества, определяемые с помощью зрения:

– внешний вид – общее зрительное ощущение, производимое продуктом;

– форма – соединение геометрических свойств (пропорций) продукта;

– цвет – впечатление, вызванное световым импульсом, определенное доминирующей длиной световой волны и интенсивностью;

– блеск – способность продукта отражать большую часть лучей, падающих на его поверхность, в зависимости от гладкости поверхности продукта;

– прозрачность – свойство жидких продуктов, определяемое степенью пропускания света через слой жидкости определенной толщины.

Показатели качества, определяемые с помощью глубокого осязания (нажима):

– консистенция – свойство продукта, обусловленное его вязкостью и определяемое степенью деформации во время нажима;

– плотность – свойство сопротивления продукта нажиму;

– эластичность – способность продукта возвращать первоначальную форму после нажима, не превышающего критической величины (предела эластичности).

Показатели качества, определяемые обонянием:

– запах – впечатление, возникающее при возбуждении рецепторов обоняния, определяемое качественно и количественно;

– аромат – приятный естественный характерный запах исходного сырья (молока, фруктов, специй и др.);

– «букет» – приятный развивающийся запах под влиянием сложных процессов, происходящих во время созревания, брожения и ферментации (например, «букет» выдержанного вина).

Показатели качества, определяемые в полости рта:

– сочность – впечатление осязания, производимое соками продукта во время разжевывания (например, продукт сочный, малосочный, суховатый, сухой);

– однородность – впечатление осязания, производимое размерами частиц продукта (однородность шоколадной массы, конфетных начинок);

– консистенция – осязание, связанное с густотой, клейкостью продукта, силой нажима; она чувствуется при распределении продукта на языке (консистенция жидкая, сиропообразная, густая, плотная);

– волокнистость – впечатление, вызываемое волокнами, оказывающими сопротивление при разжевывании продукта, которое можно ощущать качественно и количественно (например, мясо с тонкими волокнами);

– крошливость – свойство твердого продукта крошиться при раскусывании и разжевывании, обусловленное слабой степенью сцепления между частицами;

– нежность – условный термин, оценивается как сопротивление, которое оказывает продукт при разжевывании (например, мягкое яблоко, хрустящий огурец, нежное мясо);

– терпкость – чувство осязания, вызванное тем, что внутренняя поверхность полости рта стягивается и при этом появляется сухость рту;

– вкус – чувство, возникающее при раздражении рецепторов и определяемое как качественно (сладкий, соленый, кислый, горький), так и количественно (интенсивность вкуса);

– флевор, или вкусность – комплексное впечатление вкуса, запаха и осязания при распределении продукта в полости рта, определяемое как качественно, так и количественно.

Способность к осязанию зависит от внешних факторов и индивидуальных особенностей дегустаторов. При отрицательной температуре осязательная восприимчивость рецепторов снижается. С возрастом осязание человека обычно ослабевает, но в меньшей степени по сравнению с другими органами чувств. По опубликованным данным, человек теряет 50 % остроты зрения и слуха к 13–15 годам, восприятия обоняния и вкуса к 22–29 годам, осязательной чувствительности к 60 годам. Фактор возраста не является определяющим. В зависимости от природных данных, образа жизни, питания, привычек, характера труда, тренированности сенсорных органов с возрастом человека может повышаться чувствительность обоняния, вкуса, осязания, значительно реже – слуха и зрения.

Консистенция продукта воспринимается потребителем как сумма вкуса, запаха и ощущений.

Консистенция взаимосвязана не только с вкусовыми свойствами и запахом продукта, но также влияет на усвояемость или характеризует свежесть. Например, о безупречной свежести охлажденного мяса судят по запаху и эластичности мышечной ткани.

В настоящее время для создания хорошей консистенции мясных продуктов применяют функциональные добавки: загустители, студнеобразователи, эмульгаторы, стабилизаторы, пенообразователи и другие вещества. Механизм их действия состоит в изменении коллоидных систем продуктов. Среди них получили распространение различные пектины, желатин, крахмал и его модификации, агар и агароид, целлюлоза и модифицированная целлюлоза, альгинат морских водорослей, лецитины, хитозаны, конденсированные фосфаты и полифосфаты.

Органолептические показатели могут указывать на степень развития автолитических процессов, проходящих при хранении, свежесть, характер и глубину развития микробиологических процессов.

Обычно гнилостная порча начинается с поверхности, а затем проникает в толщу мяса, причем скорость порчи зависит от температуры и влажности окружающей среды, состояния поверхности (корочка подсыхания, порезы) и гистологической структуры, вида бактерий, возбуждающих гнилостный распад.

Различные виды порчи взаимосвязаны. Ослизнение, протекающее при повышенных температурах и относительной влажности

воздуха более 90 %, сопровождается сплошным ростом бактерий. Плесени, развивающиеся в кислой среде, сдвигают pH в щелочную сторону и подготавливают условия для жизнедеятельности гнилостных микроорганизмов.

В результате развития гнилостный микрофлоры происходит распад белка с образованием как первичных, так и вторичных продуктов гидролиза, оказывающих существенное влияние на органолептические показатели и пищевую ценность мяса.

В ходе превращения белковых веществ в мясе накапливаются карбоновые жирные (уксусная, масляная, муравьиная) и оксикислоты, амины, альдегиды, а также неорганические соединения (H_2O, NH_3, CO_2, N_2, H_2S) и вещества, изменяющие вкус и запах (фенол, крезол, индол, скатол, меркаптан). Биологическая ценность мяса падает за счет распада белковых веществ. Процесс гнилостной порчи частично затрагивает и липидную фракцию.

Изменение цвета обусловлено образованием мет- и сульфомиоглобина, появлением пигментации желто-зеленого цвета и обесцвеченных участков под воздействием перекиси водорода и специфических пигментов, выделяемых некоторыми микроорганизмами. Консистенция мяса ухудшается, возрастает его рыхлость.

В процессе переработки и хранения жировой ткани убойных животных или выделенных из нее жиров происходят разнообразные превращения под влиянием биологических и физико-химических факторов. Контакт жировой ткани мяса с кислородом воздуха, водой, микроорганизмами, металлами и т. п. вызывает физико-химические и биологические процессы, изменяющие свойства жирового сырья и тканей мяса. Интенсивность изменений зависит как от свойств сырья, так и от условий хранения. Окислительные и гидролитические процессы могут вызвать порчу жиров. В результате изменяется их химический состав, ухудшаются органолептические показатели и пищевая ценность. Процессы гидролиза и окисления часто протекают одновременно, усиливая изменения жира.

Степень порчи жиров исследуют не только органолептическими, но и различными химическими методами. Результаты определений обычно характеризуют условными единицами – кислотным, перекисным и другими числами. Гидролитическая порча жиров характеризуется накоплением свободных жирных кислот. Это может быть, как следствием автолиза, так и результатом действия

других факторов: кислот, щелочей, оксидов металлов и других неорганических катализаторов, а также ферментов микроорганизмов.

Под влиянием тканевых липаз наблюдается гидролитический распад триглицеридов, в результате чего отмечается нежелательное для качественной характеристики жира накопление свободных жирных кислот, выражающееся в повышении кислотного числа жира. В свежей жировой ткани, только что извлеченной из туши, кислотное число невелико и не превышает 0,05–0,2.

Появление в жире при гидролитическом распаде небольшого количества высокомолекулярных жирных кислот не вызывает изменения вкуса и запаха продукта. При наличии в составе триглицеридов низкомолекулярных кислот при гидролизе могут образоваться капроновая и масляная кислоты, обладающие неприятным запахом и специфическим вкусом, резко ухудшающими органолептические свойства продукта.

В топленых жирах автолитического расщепления жира, как правило, не наблюдается. Это объясняется инактивацией содержащейся в жировой ткани липазы при достижении температуры 60 °С в процессе вытопки. Гидролитическая порча топленого жира возможна при наличии влаги, обсеменении микрофлорой, неполной денатурации белков при вытопке жира или присутствии неорганических катализаторов.

В процессе хранения и переработки жиров возможны их окислительные изменения, которые могут протекать с различной скоростью, глубиной, иметь различную направленность в зависимости от природных свойств жира и условий окисления.

Окисление жиров (автоокисление) протекает при низких температурах, в присутствии газообразного кислорода.

О начале и глубине окисления жира судят по величине перекисного числа. В свежем жире перекисей нет. В начальных стадиях окисления в течение некоторого времени химические и органолептические показатели жира почти не изменяются. Этот период, имеющий для различных жиров разную продолжительность, называют индукционным. После окончания индукционного периода жир начинает портиться. Это обнаруживается по росту перекисного числа и изменению органолептических свойств жира. Наличие ин-

дукционного периода объясняется малым количеством частиц с повышенной кинетической энергией (возбужденных или свободных радикалов) в начале процесса.

Продолжительность индукционного периода зависит от массовой доли естественных (каротиноиды, токоферолы, лецитин, витамины А и К) или искусственных (производные фенола, содержащиеся в коптильном дыме, некоторые природные специи или их экстракты, бутилоксианизол, бутилокситолуол) антиокислителей, природы жира и условий хранения. Механизм действия антиокислителей состоит в их более активном взаимодействии со свободными радикалами и кислородом воздуха, за счет чего радикалы выводятся из сферы реакции и цепь обрывается.

Контрольные вопросы

1. Какие свойства мяса понимают под понятием качества пищевых продуктов?
2. Перечислите наиболее важные группы свойств для всех мясных объектов.
3. Приведите определение понятию органолептические свойства продукта.
4. Какие добавки применяют для улучшения функционально-технологических свойств фарша?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТИ МЯСА И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Цель и задачи работы: освоить ферментативный метод определения биологической ценности мяса и мясных продуктов in vitro. В задачи работы входит определение перевариваемости белков мяса, мясных продуктов, других пищевых белковых систем пищеварительными ферментами in vitro; сравнительная оценка перевариваемости мяса исследуемых образцов.

Методические указания

Основой метода является ферментативный гидролиз в условиях, при которых доступность атакуемых пептидных связей определяется не только свойствами белка, но и дополнительными факторами, связанными со структурой и химическим составом пищевого продукта.

Метод заключается в последовательном воздействии на белковые вещества исследуемого объекта системой протеиназ, состоящей из пепсина и трипсина, при непрерывном перемешивании и удалении из сферы реакции продуктов гидролиза диализом. К достоинствам метода относится отсутствие ингибирования реакции низкомолекулярными пептидами и свободными аминокислотами.

Гидролиз проводят в специальном приборе (рисунок 6), состоящем из нескольких ячеек, каждая из которых имеет наружный и внутренний сосуды, разделенные полупроницаемой мембраной.

О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я: образцы мяса разных видов убойных животных и птицы аналогичных анатомических участков, субпродуктов I и II категории, других вторичных продуктов убоя скота, препараты растительных белков, мясные продукты различных ассортиментных групп кулинарной готовности, комбинированные и другие белковые продукты.

Материалы, реактивы, оборудование: раствор соляной кислоты молярной концентрацией 0,02 моль/дм^3; пепсин кристаллический (активность не менее 2500 ед./мг белка); раствор гидроксида натрия молярной концентрацией 5 моль/дм^3; бикарбонатный буфер

с pH 8,2–8,6; трипсин кристаллический (активность 8 ТЕ в 1 г препарата); тирозин;; прибор для определения перевариваемости in vitro; спектрофотометр или фотоэлектролориметр; охлажденный раствор вольфрамата натрия с массовой долей 10 %; нож или мясорубка; часовое стекло; аналитические весы.

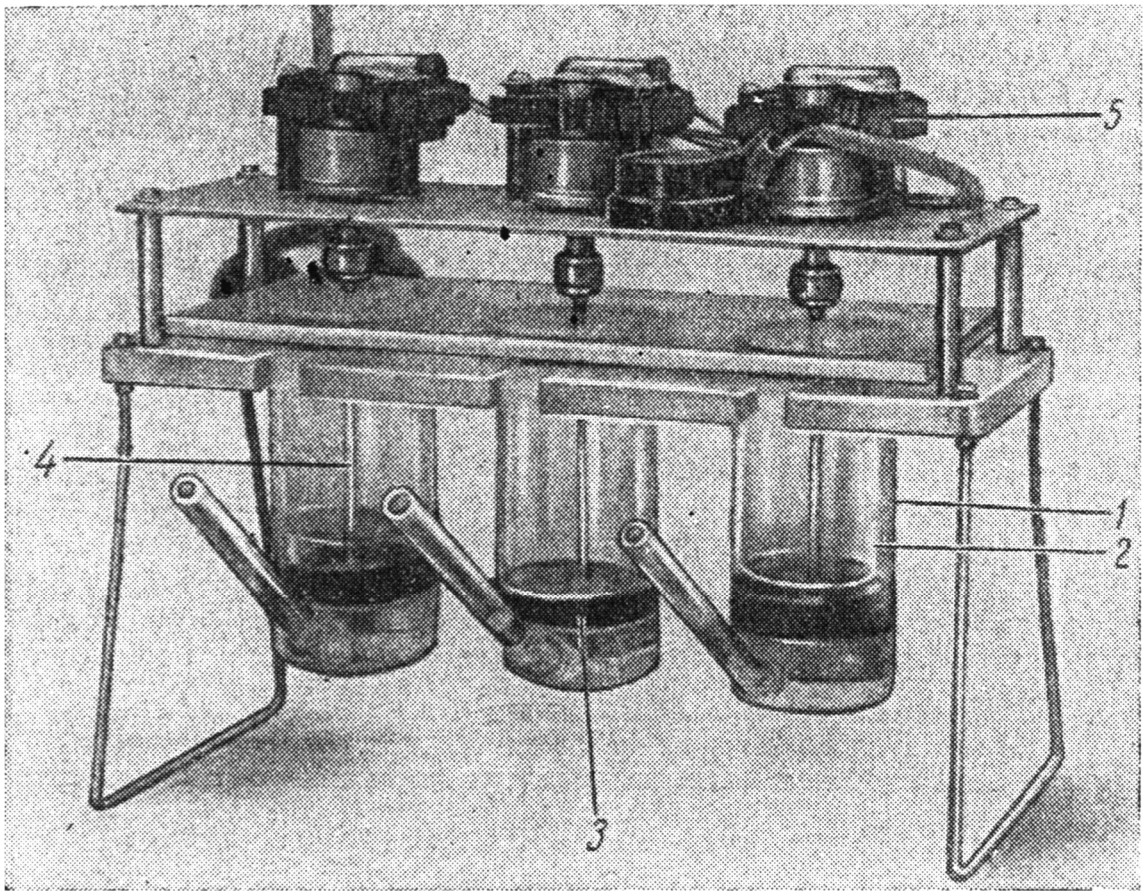


Рисунок 6 – Прибор для проведения гидролиза:
1 – наружный сосуд; 2 – внутренний сосуд; 3 – мембрана; 4 – мешалка;
5 – электромоторчик

Подготовка проб

Пробы мясных продуктов измельчают ножом на часовом стекле или на мясорубке. На аналитических весах берут навеску пробы продукта из расчета содержания в ней около 150 мг белка.

Ход работы

Пробу продукта помещают во внутренний сосуд прибора. Туда же вносят 15 $см^3$ раствора соляной кислоты концентрацией

0,02 моль/дм^3 (pH 1,2). В наружный сосуд в целях соблюдения изотонии вводят 60 см^3 того же раствора. Внутренний сосуд вставляют в наружный так, чтобы нижняя поверхность его дна погружалась в раствор при условии равенства уровней жидкостей во внутреннем и наружном сосудах. Пробы инкубируют в термостате при 37 °С. По достижении уравнивания температуры во всей системе во внутренний сосуд вносят 15 мг кристаллического пепсина. Концентрация фермента при этом равна 1 мг/см^3, то есть соответствует средней его концентрации в желудочном содержимом на высоте переваривания. Реакцию проводят при перемешивании жидкости мешалкой при частоте вращения 1 с$^{-1}$. Через каждый час из сосудов отбирают пробы: из внутреннего 0,1 см^3, из наружного 1 см^3. После этого в сосуды вносят равный объему взятой пробы объем раствора соляной кислоты (0,02 моль/дм^3).

Для остановки протеолиза и осаждения непереваренного белка пробу из внутреннего сосуда разбавляют в 10 раз охлажденным раствором вольфрамата натрия с массовой долей 10 %. После центрифугирования определяют продукты гидролиза методом Лоури.

Для проведения дальнейшего гидролиза продуктов пепсинового переваривания трипсином жидкость из наружного сосуда заменяют равным объемом раствора $NaHCO_3$ концентрацией 0,02 моль/дм^3 (pH 8,2). Пепсиновый перевар во внутреннем сосуде нейтрализуют при достаточно быстром перемешивании 0,4 см^3 раствора NaOH (2 моль/дм^3), после чего к нему прибавляют 15 см^3 раствора $NaHCO_3$ (0,02 моль/дм^3). После уравнивания температуры во внутренний сосуд вносят 15 мг кристаллического трипсина.

Последующие процедуры проводят аналогично определению атакуемости белков пепсином.

Степень атакуемости белков в составе исследуемого продукта оценивают по нарастанию продуктов гидролиза в результате ферментативного переваривания. Значения концентрации тирозина, определенные по калибровочному графику, пересчитывают на общий объем жидкости наружного и внутреннего сосудов, а затем суммируют. Из концентрации тирозина, характеризующей степень гидролиза, вычитают показатели, полученные в контрольных опытах:

первый контроль – раствор фермента; второй контроль – взвесь анализируемого продукта в буферном растворе.

Расчеты проводят по формуле:

$$К = А – В – С, \quad (27)$$

где К – нарастание продуктов гидролиза вследствие действия протеолитического фермента, мкг/см^3;

А – концентрация продуктов гидролиза в переваре, мкг/см^3;

В – концентрация тех же продуктов во взвеси пищевого продукта, мкг/см^3;

С – концентрация тех же продуктов в растворе фермента, мкг/см.

Накопление продуктов гидролиза, определяемое по цветной реакции Лоури, выражают в условных единицах (мкг тирозина на 1 г сухого вещества).

Оформление результатов

Результаты экспериментов и расчетов представляют в виде таблицы:

Наименование и краткая характеристика продукта	Накопление продуктов ферментативного гидролиза, мкг/см^3, при длительности гидролиза, ч					
	пепсином			трипсином		
	1	2	3	4	5	6

По полученным данным строят графики зависимости накопления продуктов ферментативного переваривания от продолжительности гидролиза, самостоятельно формулируют заключение. При этом обращают внимание на влияние способов тепловой обработки на перевариваривариваемость белков мясных продуктов.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЖИВОТНЫХ ЖИРОВ

Цель и задачи работы: освоить методы анализа качественных показателей пищевых животных жиров на основе химических, физико-химических и физических методов анализа. В задачи работы входит: ознакомление с методами отбора проб пищевых животных жиров; органолептическое исследование; определение физико-химических показателей качества (массовую долю влаги, кислотное число) и заключение о сорте исследуемого жира; оценка степени окислительной порчи жира по реакции с нейтральным красным, перекисному числу, результатом люминесцентного анализа или с использованием других методов исследования, заключение о степени доброкачественности исследуемого жира.

Методические указания

Качество жиров определяется по органолептическим, физико-химическим показателям, а также по так называемым стандартным числам.

К и с л о т н о е ч и с л о является одним из основных показателей качества жиров. В процессе производства этот показатель характеризует глубину гидролитического распада, а в процессе хранения – может указывать на окислительную порчу наряду с другими более характерными показателями, а также является косвенным показателем соблюдения температурного режима при сборе и подготовке жира-сырца к вытопке.

Пищевые животные жиры, выпускаемые промышленностью, относятся к высшему, первому сорту и сборному. Сорт жира устанавливают в зависимости от органолептических показателей, массовой доли влаги и кислотного числа.

О степени окислительной порчи жира судят по перекисному числу, которое характеризуется количеством йода, выделяемого в кислой среде из иодида калия под действием перекисей, содержащихся в 100 г жира.

Для определения содержания перекисей обычно применяют йодометрический метод в различных вариантах, которые различаются

количеством и соотношением применяемых растворителей и уксусной кислоты, способом введения йодистого калия, продолжительностью взаимодействия с жиром до титрования тиосульфатом, способом выражения перекисного числа. Метод основан на способности перекисей в кислой среде окислять йодид калия с освобождением молекулярного йода, который затем определяют титрованием раствором гипосульфита натрия, используя в качестве индикатора крахмал. Химизм протекающих реакций приведен ниже:

$$KJ + CH_3COOH \rightarrow HJ + CH_3COOK;$$

$$CH_3(CH_2)_6\,CH\,\underset{|}{\overset{O\,-\,OH}{-}}\,CH = CH(CH_2)_7\,COOH + 2HJ \rightarrow$$

$$\rightarrow CH_3(CH_2)_6\,CH\,\underset{|}{\overset{OH}{-}}\,CH = CH(CH_2)_7\,COOH + H_2O + J_2$$

$$J_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2NaJ + Na_2S_4O_6.$$

Желательно эксперимент проводить так, чтобы после смешения всех реагентов получился гомогенный раствор и обеспечивалась одинаковая продолжительность реакции от момента введения йодида калия до титрования, так как количество йода увеличивается с течением времени.

Хотя многие гидроперекиси токсичны, в индукционном периоде количество их крайне незначительно. Такой жир пригоден в пищу. В зависимости от перекисного числа определяют степень свежести жира: жир с перекисным числом до 0,03 % йода считается свежим; от 0,03 до 0,06 % – непригоден для хранения, но его можно употреблять на пищевые цели. При значении перекисного числа от 0,06 до 0,1 % йода жир считается сомнительной свежести, а при перекисном числе более 0,1 % – испорченным и непригодным в пищу.

В результате окислительной порчи в жире накапливаются альдегиды, кетоны, низкомолекулярные жирные кислоты, оксикислоты и др. Многие из этих продуктов токсичны для человека.

Для наблюдения за окислением жиров при их получении, хранении и в процессе переработки следует правильно решить вопрос о выборе методов контроля. Наиболее универсальным методом,

пригодным для всех случаев, является определение содержания перекисных соединений. Однако положительная проба на перекиси не всегда является доказательством того, что жир испорчен, так как перекиси не имеют ни вкуса, ни запаха. Поэтому при исследовании более глубоких стадий окисления, приводящих к накоплению вторичных продуктов, нельзя ограничиваться определением какой-либо одной группы веществ, так как распад перекисей идет по-разному, что зависит от жирнокислотного состава жира, температурных условий, наличия или отсутствия ингибиторов. Для количественной оценки содержания карбонильных соединений в жирах определяют тиобарбитуровое и бензидиновое числа. Оба метода достаточно чувствительны, но дают хорошие результаты только при анализе жиров с одинаковым составом жирных кислот. Для количественной оценки содержания в жирах полиоксикислот и др. используют определение суммарного содержания продуктов окисления, нерастворимых в петролейном эфире.

В связи с изложенным не представляется возможным для характеристики степени окисленности жиров использовать только один какой-либо показатель. Для этого, помимо химических методов, применяют и современные инструментальные методы – ультрафиолетовую спектроскопию с максимумом поглощения в интервале длин волн 226–300 нм и инфракрасную спектроскопию – в пределах 984–988 $см^{-1}$.

При выполнении лабораторных работ или при анализе жиров в производственных лабораториях рекомендуется освоить и использовать несколько методов из приведенных ниже.

Органолептическим исследованием при окислительной порче обнаруживают признаки прогоркания или осаливания жира.

При прогоркании в жире накапливаются альдегиды, кетоны, низкомолекулярные жирные кислоты, эфиры и др. Жир приобретает зеленоватый или желтый цвет, резкий неприятный запах, острый горький вкус.

Осаливание характеризуется образованием в жире оксикислот, а также продуктов полимеризации и конденсации жирных кислот. Жир теряет свою естественную окраску, обесцвечивается, становится более плотным, приобретает мажущуюся консистенцию, неприятный салистый запах. Температуры плавления и застывания повышаются.

Степень свежести (доброкачественности) жиров устанавливают органолептическим исследованием, определением кислотного числа, качественной реакцией на свободные жирные кислоты, качественным и количественным определением перекисей, альдегидов и кетонов, люминесцентным исследованием и др. По степени свежести жиры делятся на свежие; свежие, не подлежащие хранению; сомнительной свежести и испорченные.

В работе предлагается изучить несколько различных способов определения качественных показателей жиров, каждый из которых может быть использован независимо или в совокупности для повышения объективности оценки.

О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я : жиры и жиропродукты, полученные из сырья различными технологическими способами.

Материалы, реактивы, оборудование: 1. Весы лабораторные; эксикатор, баня водяная; бюксы стеклянные или металлические; колбы конические вместимостью 150–500 см^3; шпатели металлические; стекла предметные; бюретка с делениями на 0,1 см^3; спиртовой раствор фенолфталеина с массовой долей 1 %; раствор гидроксида калия или гидроксида натрия молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3; нейтральная смесь спирта с эфиром 1 : 2 (одну часть этилового спирта смешивают с двумя частями этилового эфира и нейтрализуют раствором гидроксида калия или гидроксида натрия молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 до бледно-розовой окраски по фенолфталеину); пробирки из бесцветного стекла с внутренним диаметром 13–17 мм, высотой 150 мм; термометр стеклянный технический с диапазоном измерения 0…100 °С; шкаф лабораторный сушильный. 2. Флоуроскоп; часы песочные на 3 мин или секундомер; фарфоровые ступки с пестиком; стеклянные палочки; пробирки химические; пробки резиновые; стекла предметные; колбы конические с притертыми пробками вместимостью 200–250 см^3; цилиндры мерные вместимостью 10 и 100 см^3; пипетки мерные вместимостью 0,5 и 2 см^3; микробюретка вместимостью от 2 до 5 см^3 с делениями на 0,01–0,02 см^3; раствор нейтрального красного, свежеприготовленный на водопроводной воде, с массовой долей 0,01 %; спиртовой раствор гвояковой смолы с массовой долей 5 %; раствор флороглю-

цина в эфире с массовой долей 1 %; раствор флороглюцина в ацетоне с массовой долей 1 %; хлороформ; ледяная уксусная кислота; насыщенный свежеприготовленный раствор йодистого калия; раствор крахмала с массовой долей 1 %; раствор серноватистокислого натрия (гипосульфита) молярной концентрацией 0,01 моль/дм^3; соляная кислота (плотностью 1,19 г/см^3); концентрированная серная кислота; насыщенный раствор резорцина в бензоле. 3. Изооктан, абсолютный свободный от альдегидов этиловый спирт, свежеприготовленный раствор бензидина массовой долей 0,5 %; бутиловый спирт; сульфат натрия кристаллический. 4. Спиртовой раствор гидроксида калия молярной концентрацией 2 моль/дм^3; раствор соляной кислоты с объемной долей 10 %; петролейный эфир, раствор этилового спирта с объемной долей 96 %, смесь этилового спирта с хлороформом (1 : 1), метиловый оранжевый; свежая кровь убойных животных; колба с воздушным холодильником вместимостью 250 см^3, делительная воронка вместимостью 500 см^3; мерная колба вместимостью 25 см^3.

Подготовка проб

Отбор проб проводят на глубине не менее 50 см от поверхности. От партии жира в брикетах, стаканчиках, банках и другой потребительской упаковке точечные пробы отбирают массой до 50 г после вскрытия или снятия упаковки. Точечные пробы, помещенные в чистую сухую банку, составляют объединенную пробу. Масса объединенной пробы должна быть не менее 600 г.

Ход работы

1. Органолептическая оценка.

З а п а х и в к у с определяют в средней пробе жира при температуре 20 °С. При определении вкуса пробы не проглатывают. Эти показатели должны быть характерными для данного вида жира, вытопленного из доброкачественного сырья. Для жиров высшего сорта посторонние запах и вкус не допускаются. Для жиров I сорта допускается приятный поджаристый запах и вкус. Сборные жиры могут обладать запахом и вкусом поджаристым, бульона и шквары.

К о н с и с т е н ц и ю определяют в общей пробе надавливанием металлическим шпателем на жир при температуре 15…20 °С. Она

должна быть, независимо от сорта, для говяжьего и бараньего жира плотной или твердой (для курдючного – мазеобразной), для свиного и конского жира – мазеобразной или плотной, для костного сборного жира – жидкой, мазеобразной или плотной.

Ц в е т устанавливают при температуре 15…20 °С. Для этого жир наносят на предметное стекло (лучше на пластинку молочного стекла) толщиной около 5 мм. Исследование проводят в отраженном дневном рассеянном свете. Устанавливают цвет и оттенок испытуемого жира, например, желтый, светло-желтый, светло-желтый с зеленоватым оттенком и т. д.

При порче цвет жира приобретает темно-серые, желтые, коричневые, зеленоватые тона или же обесцвечивается. Характерным признаком порчи служит неравномерность, пестрота окраски. Жир становится мутным, с затхлым, кислым, прогорклым и сальным запахом, горьким вкусом, мажущейся консистенцией.

Для определения п р о з р а ч н о с т и в пробирку помещают жир с таким расчетом, чтобы заполнить расплавленным жиром не менее половины пробирки. Пробирки с жиром помещают в водяную баню для расплавления жира. Расплавленный жир, имеющий температуру 60…70 °С, рассматривают в дневном рассеянном проходящем свете. При наличии в жире пузырьков воздуха пробирке дают постоять при вышеуказанной температуре в течение 2–3 мин, после чего определяют прозрачность.

Жиры высшего и первого сорта должны быть прозрачными. Для сборного жира допускается мутноватость.

2. Определение содержания влаги.

Бюксу высушивают при температуре 102…105 °С в течение 30 мин, охлаждают в эксикаторе и взвешивают с погрешностью не более 0,0002 г. Вносят в нее 2–3 г исследуемого жира, взвешивают и высушивают при такой же температуре до постоянной массы.

При исследовании жира, взятого сразу же после вытопки, первое взвешивание проводят после высушивания в течение часа, последующие – через каждые 30 мин. Если жир находился на хранении, первое взвешивание проводят после высушивания в течение 30 мин, последующие – через 15 мин. Постоянная масса считается достигнутой, если ее уменьшение при двух последних взвешиваниях не превышает 0,0002 г. Если после очередного взвешивания

будет установлено увеличение массы, то для расчета берут наименьшую массу бюксы с жиром.

Массовую долю влаги (x, %) определяют по формуле:

$$x=[(м_1–м_2)\times100]/м, \quad (28)$$

где $м_1$ – масса бюксы с жиром до высушивания, г;

$м_2$ – масса бюксы с жиром после высушивания, г;

$м$ – масса навески исследуемого жира, г.

Разница межу результатами параллельных определений не должна превышать 0,05 %

3. Определение кислотного числа

В коническую колбе вместимостью 150–200 см^3 взвешивают 3–5 г исследуемого жира с погрешностью не более 0,001 г. Жир расплавляют на водяной бане, приливают 50 см^3 нейтрализованной эфирно-спиртовой смеси (ее объем не менее чем в 10 раз должен превышать навеску жира) и взбалтывают. Добавляют 3–5 капель спиртового раствора фенолфталеина с массовой долей 1 %. Полученный раствор при постоянном встряхивании быстро титруют раствором гидроксида калия молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 до появления отчетливой розовой окраски, не исчезающей в течение одной мины. Если при титровании жидкость мутнеет, то в колбу добавляют 5–10 см^3 эфирно-спиртовой смеси и взбалтывают до исчезновения мутности или же колбу с содержимым слегка нагревают на водяной бане, затем охлаждают до комнатной температуры и заканчивают титрование.

Кислотное число (x_2, мг КОН) вычисляют по формуле

$$x_2 = (v \cdot k \cdot 5{,}61)/m, \quad (29)$$

где v – объем (0,1 моль/ дм^3) раствора гидроксида калия или гидрокисида натрия, израсходованный на титрование, см^3;

$к$ – поправка к раствору щелочи для пересчета на точный (0,1 моль/ дм^3) раствор;

5,61 – количество мг гидрокисида калия, содержащегося в 1 см^3 (0,1 моль/ дм^3) раствора;

m – навеска жира, г.

Расхождение между результатами двух параллельных определений не должно превышать 0,1.

4. Определение степени окислительной порчи жира.

Реакция с нейтральным красным

В фарфоровую ступку помещают 0,5–1 г исследуемого жира, заливают раствором нейтрального красного с массовой долей 0,01 %, растирают пестиком в течение мины. Раствор нейтрального красного сливают, а его остатки смывают водопроводной водой. Оценивают окраску жира.

Степень окислительной порчи жира определяют по таблице 7, результаты фиксируют в тетради.

Таблица 7 – Показатели свежести жиров по реакции с нейтральным красным

Показатели свежести	Жир свиной и бараний (окраска)	Жир говяжий (окраска)
Свежий	От желтой с зеленоватым оттенком до желтой	От желтой до коричневой
Свежий, не подлежит хранению	От темно-желтой до коричневой	От коричневой до коричнево-розовой
Сомнительной свежести	От коричневой до розовой	От коричнево-розовой до розовой
Испорченный	От розовой до красной	От розовой до красной

Качественная реакция на перекиси (по Вентилеску и Попеску)

В пробирку помещают около 5 г жира, расплавляют его на водяной бане, добавляют 5 капель свежей крови, 5–10 капель спиртового раствора гвояковой смолы и 5 $см^3$ дистиллированной воды. Пробирку закрывают пробкой и встряхивают. При наличии перекисей они расщепляются с освобождением атомарного кислорода, который окисляет гвояковую смолу, и появляется голубая окраска, интенсивность которой зависит от количества перекисей.

Оформление результатов

На основании анализа органолептических и физико-химических показателей, полученных экспериментально, и студенты самостоятельно формулируют выводы.

На основании оценки совокупности показателей окислительной порчи делают выводы о доброкачественности жиров.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3
ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ЖИВОТНЫХ ЖИРОВ

Цель и задачи работы: освоить методы практического определения биологической ценности пищевых животных жиров. В задачи работы входит определение содержания полиненасыщенных (эссенциальных) жирных кислот в разных видах пищевых животных жиров; количественная оценка содержания в разных видах животных жиров жирных кислот с сопряженными двойными связями (ди-, тритетра- и пентаеновых); количественное определение в пищевых животных жирах жирорастворимых витаминов (каротиноидов, токоферолов); сравнительная оценка биологической ценности разных видов пищевых животных жиров.

Методические указания

Для изучения различных характеристик жиров, контроля их качества в процессе технологической обработки и хранения, а также оценки биологической ценности в настоящее время используется ряд физических методов.

Определение полиненасыщенных жирных кислот возможно проводить спектрофотометрическим методом в ультрафиолетовой области спектра. Метод качественного и количественного определения полиненасыщенных жирных кислот в различных жировых продуктах получил широкое применение в связи с достаточной экпрестностью и высокой специфичностью.

Ненасыщенные жирные кислоты обладают различной способностью поглощать световую энергию в области спектра ниже 200 нм. Но эта область спектра (область вакуумного ультрафиолета) не доступна в настоящее время для широкого круга исследований, поэтому различия в светопоглощении кислот нельзя использовать для аналитических целей. Однако сопряженные системы из двух, трех и более двойных связей поглощают в ультрафиолетовой области при длине волны более 220 нм (область, легко доступная для измерения). Изомеризация нагреванием в щелочной среде приводит к возникновению сопряженных систем.

Анализ является эмпирическим, что требует особого внимания к условиям его проведения. Должны строго соблюдаться продолжительность изомеризации, дозировка и концентрация применяемых реагентов и т. д.

Визуальный люминесцентный анализ является экспрессным, но недостаточно объективным. Применяется, в основном, при анализе биологически активных веществ, например, витаминов. Флуорометрические методы довольно длительны и не позволяют анализировать продукты, не разделяя их на составляющие. При выделении анализируемых витаминов в свободном виде с помощью кислот, щелочей или ферментативного гидролиза, омыления, автоклавирования и других способов, может происходить частичное разрушение анализируемого вещества, которое влияет на конечные результаты флуорометрического анализа.

Спектральные люминесцентные методы анализа пищевых продуктов обладают явными преимуществами по сравнению с визуальными люминесцентными и флуометрическими методами. Спектральные люминесцентные методы анализа являются объективными, что выгодно отличает их от визуальных люминесцентных и других органолептических методов анализа пищевых продуктов.

Отсутствие контакта с анализируемым объектом, практическая безынерционность светового луча как возбуждающего света, так и света люминесценции, относительная простота измерительного устройства, возможность автоматизации измерений, высокая чувствительность, точность и специфичность – весь этот комплекс характеристик спектральных люминесцентных методов анализа создает возможность использования их в самых разнообразных направлениях, связанных с экспресс-контролем качества и количественного определения биологически активных веществ в пищевых продуктах.

Линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты люминесцируют в виде маслянистых растворов.

Характерной особенностью линолевой кислоты является наличие на ее спектре возбуждения люминесценции наиболее интенсивного максимума при 325 нм. Для линоленовой и особенно арахидоновой кислот большей интенсивностью обладает максимум при 355 нм. Сравнение спектров возбуждения люминесценции полине-

насыщенных жирных кислот со спектрами их поглощения позволяет установить между ними определенную связь. Все максимумы, наблюдающиеся на спектрах возбуждения люминесценции полиненасыщенных жирных кислот, сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с максимумами поглощения, которые находятся при длинах волн меньше 210 нм.

Таким образом, при непосредственном возбуждении люминесценции маслянистых растворов полиненасыщенных жирных кислот (но не их разбавленных растворов) максимальное возбуждение (т. е. максимальное активное поглощение) наблюдается в той области спектра, в которой происходит незначительное поглощение молекулами этих кислот.

Характер спектра люминесценции может служить свидетельством наличия или отсутствия жирных кислот в пищевых продуктах. Особенно информативным в этом отношении является спектр линоленовой кислоты, на котором кроме полосы при 400 нм, присущей всем трем неокисленным полиненасыщенным кислотам, наблюдается обычно дополнительная коротковолновая полоса, расположенная вблизи 390 нм.

Своеобразие спектра поляризации арахидоновой кислоты, на котором выявляется как область положительной поляризации (имеющаяся у двух других кислот), так и область отрицательной поляризации (отсутствующая на соответствующих спектрах линолевой и линоленовой кислот), может явиться дополнительным аргументом при решении вопроса об идентификации этой кислоты.

Для идентификации жирных кислот очень полезным является определение хода температурной зависимости интенсивности люминесценции, на котором температурной области плавления каждой кислоты соответствует резкое изменение интенсивности люминесценции.

Данная лабораторная работа предусматривает использование физических методов в анализе биологической ценности жиров по наличию ненасыщенных жирных кислот и витаминных примесей.

О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я: образцы пищевых животных жиров разных видов (говяжий, бараний, свиной, конский, костный, сборный).

Материалы, реактивы, оборудование: 1. Этиленгликоль; гидроксид калия в таблетках (массовая доля основного вещества 85 %); метиловый или этиловый спирт; аналитические весы; ультратермостат; изолированная баня; мешалка; стеклянные стаканы; круглодонные колбы из молибденового стекла или стекла пирекс; стеклянные пробирки; мерные колбы вместимостью 1000 см^3; спектрометр. 2. Аналитические весы; стеклянные стаканы; углеводородный растворитель (н-гексан, циклогексан или изооктан). 3. Водяная баня или термостат; спектрофотометр. 4. Фарфоровые ступки; обезвоженный сульфат натрия; кристаллический карбонат натрия; бензин; петролейный эфир или ацетон; вакуумный фильтр; воронка Бюхнера; этиловый спирт; бихромат калия; хлороформ; реактив Эммери-Энгеля.

1. Анализ ненасыщенных жирных кислот спектрофотометрическим методом.

Количественное определение полиненасыщенных жирных кислот

Подготовка проб

Жиры предварительно подвергают изомеризации. Для этого готовят раствор из 8 г гидроксида калия в 100 см^3 этиленгликоля. Если массовая доля основного вещества в гидроксиде калия ниже 85 % (но не менее 81 %), то навеску соответственно увеличивают. Сначала этиленгликоль высушивают, для чего навеску его помещают в круглодонную колбу (из стекла пирекс или молибденового) вместимостью 150–200 см^3 и погружают в нагретый до 100 °С ультратермостат (или баню), повышают температуру до 190 °С и выдерживают при этой температуре в течение 10 мин, затем понижают температуру.

По достижении 120 °С к этиленгликолю в колбе осторожно по частям прибавляют гидроксид калия, встряхивают до растворения щелочи и снова помещают в термостат; поднимают температуру до 190 °С и выдерживают при этой температуре 10 мин. Затем колбу вынимают, охлаждают и при необходимости хранят раствор в холодильнике при 4 °С не более суток.

В приготовленном растворе контролируют массовую долю КОН.

Для этого нейтрализуют 90 см^3 метилового спирта по фенолфталеину. К нейтрализованному спирту прибавляют 10 г раствора КОН в этиленгликоле, перемешивают и титруют раствором соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм^3 до исчезновения розовой окраски. Рассчитывают массовую долю гидроксида калия (x, %) по формуле:

$$x = (a \cdot b \cdot 5{,}61)/c, \qquad (30)$$

где a – объем раствора соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм^3, см^3;

b – поправка;

c – масса раствора, г.

Если массовая доля КОН будет выше 6,6 %, то добавляют этиленгликоль, высушенный нагреванием при 190 °С, если ниже 6,5 %, то готовят новый раствор.

Исследуемые образцы изомеризуют при (180 ± 0,5) °С в растворе гидроксида калия в этиленгликоле с массовой долей 6,5–6,6.

Для получения температуры (180 ± 0,5) °С используют ультратермостат или изолированную баню, снабженную автоматическим устройством с контактным термометром и электрической или ручной мешалкой. Ультратермостат или баню наполняют минеральным маслом или силиконовой жидкостью с температурой вспышки не ниже 300 °С.

Для проведения щелочной изомеризации в стаканчики (из молибденового стекла или стекла пирекс) размером 14 × 10 мм взвешивают на аналитических весах около 0,1 г (с точностью до четвертого знака) исследуемого образца. В пробирки с притертыми пробками размером 20 × 150 мм отвешивают на технических весах 11 г раствора гидроокиси калия в этиленгликоле. Пробирки помещают в штатив и погружают в жидкость ультратермостата (или бани), нагретую до (180 ± 0,5) °С таким образом, чтобы глубина погружения пробирки в жидкость составляла 11,5 см.

Пробирки с содержимым нагревают 20 мин, затем в них опускают стаканчики с навесками жира. Две пробирки оставляют в качестве контрольных, в них опускают пустые стаканчики для взвешивания. Вынимают каждую пробирку из бани, энергично перемешивают в течение 5 с и снова ставят в баню. К концу первой мины нагревания пробирки вынимают из бани и проверяют раствор. Если раствор прозрачен, ставят пробирки в баню. Если раствор не прозрачен, что указывает на неполное омыление, встряхивают пробирки 2–3 раза и снова помещают в баню. За 1 мин нагревания встряхивание повторяют до тех пор, пока омыление не пройдет полностью и раствор не станет прозрачным.

Через 25 мин нагревания при (180 ± 0,5) °С, считая с момента опускания образца в щелочной раствор этиленгликоля, пробирки вынимают и быстро охлаждают, поместив их в сосуд с холодной водой. Затем содержимое пробирок количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$ с притертыми пробками, пользуясь метиловым или этиловым спиртом, желательно абсолютным, объем доводят до метки и используют прозрачные растворы для измерения оптической плотности.

Ход работы

Спектрофотометрические измерения производят на спектрофотометре в отношении контрольного раствора при следующих длинах волн: 233, 262, 268, 274, 308, 315 и 322 нм. Отсчет снимают в единицах оптической плотности или процентах пропускания. Желательно, чтобы оптическая плотность измеряемых растворов находилась в пределах 0,2–0,8. Этого добиваются либо разведением, либо используют кюветы подходящей длины или используют одновременно оба приема.

При исследовании некоторых животных жиров с учетом использования кюветы с толщиной светопоглощающего слоя 1 см примерно подходят разведения, приведенные в таблице 8.

Таблица 8 – Рекомендуемые разведения при определении полиненасыщенных жирных кислот в животных жирах спектрофотометрическим методом

Длина волны, при которой производится измерение, нм	Разведение (отношение исходного раствора к спирту)	Концентрация, г/дм^3
Свиной жир		
233	1 : 15	0,0625
262, 268,274	3 : 7	0,3
308, 315, 322	Без разведения (исходный раствор)	1,0
Говяжий, бараний и костный жиры		
233	1 : 7	0,125
262, 268, 274	1 : 1	0,5
308, 315, 322	Без разведения (исходный раствор)	1,0

Во всех случаях, когда применяют разведение, обязательно точно так же разводят контрольный раствор.

Далее рассчитывают удельный коэффициент погашения образца при каждой длине волны.

Удельный коэффициент погашения образца рассчитывают по формуле:

$$K = D/(c\text{l}), \qquad (31)$$

где D – величина измеренной оптической плотности;

l – толщина светопоглощающего слоя кюветы, см;

c – концентрация образца в окончательно разведенном для измерения оптической плотности растворе, г/дм^3.

При расчете применяют поправки. В коэффициенте удельного погашения при 233 нм учитывают постоянную поправку 0,03, зависящую от поглощения карбоксильных групп. Коэффициенты удельного погашения при 268 и 315 нм учитывают поправку на абсорбцию фона. Однако в тех случаях, когда какая-либо полиненасыщенная кислота присутствует в сравнительно больших количествах и после изомеризации дает оптическую плотность > 1, поправку на абсорбцию фона во избежание ошибки делать не рекомендуется, и в этих случаях $K_3 = K_{268}$ и $K_4 = K_{315}$.

П р и м е р . Рассмотрим расчет содержания полиненасыщенных жирных кислот в свином топленом жире.

Обозначения, принятые при расчете:

K_2 – удельный коэффициент погашения линолевой кислоты;

K_3 – удельный коэффициент погашения линоленовой кислоты;

K_4 – удельный коэффициент погашения арахидоновой кислоты;

l – толщина слоя раствора в кювете – 1,0 или 2,0 см;

D_{233}, D_{262}, D_{268}, D_{274}, D_{308}, D_{315}, D_{322} – оптическая плотность при соответствующих длинах волн:

$D_{233} = 0{,}769$; $D_{262} = 0{,}205$; $D_{268} = 0{,}252$; $D_{274} = 0{,}194$; $D_{308} = 0{,}300$; $D_{315} = 0{,}398$; $D_{322} = 0{,}192$;

c – концентрация раствора при измерении соответствующей оптической плотности, г/дм^3;

$c_{233} = 0{,}075$; $c_{268} = c_{262} = c_{274} = 0{,}300$; $c_{308} = c_{315} = c_{322} = 1{,}000$.

Массовую долю ненасыщенных жирных кислот рассчитывают в соответствии с формулами:

$$X = 1{,}086K_2 - 1{,}324K_3 + 0{,}40K_4 \qquad (32)$$

$$Y = 1{,}980K_3 - 4{,}92K_4; \qquad (33)$$

$$Z = 4{,}69K_4; \qquad (34)$$

где X, Y, Z – массовые доли соответственно линолевой, линоленовой, арахидоновой кислот, %.

Определение соединений с сопряженными двойными связями

Подготовка проб

Навеску жира массой 0,2 г отвешивают на аналитических весах в стеклянный стаканчик или чашечку. Жир растворяют в углеводородном растворителе – *н*-гексане, циклогексане или изооктане и доводят объем до 100 см^3.

Ход работы

Метод применяется для определения количества диеновых, триеновых, тетраеновых и пентаеновых кислот с сопряженными двойными связями, присутствующих в исследуемых жирах.

Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длинах волн 233, 262, 268, 274, 308, 315, 322 и 346 *нм* в отношении растворителя. Желательно, чтобы оптическая плотность находилась в пределах 0,2–0,8. Для этого подбирают кювету с подходящей толщиной оптического слоя, при необходимости растворы разбавляют. С целью установления наличия максимума при характерной длине волны измерения производят при нескольких длинах волн перед и после ожидаемого максимума поглощения. Если в характерной области спектра максимум не найден, то соединение считают отсутствующим и в дальнейшем не делают расчетов для этой области.

По полученным величинам оптической плотности рассчитывают удельные коэффициенты погашения для соединений с сопряженными двойными связями.

Расчет ведут для каждой длины волны по формуле:

$$K^c = \frac{D}{cl}, \qquad (35)$$

где D – измеренная величина оптической плотности;

c – концентрация раствора, используемого для измерения (концентрированного или разбавленного), г/дм^3;

l – толщина оптического слоя, см.

Оформление результатов

Экспериментально полученные данные и результаты расчетов сводят в таблицу вида:

Показатель	Образцы жира		
	Говяжий	Свиной	Бараний
1	2	3	4
Удельные коэффициенты погашения полиненасыщенных жирных кислот:			
линолевой K_2			
линоленовой K_3			
арахидоновой K_4			
Удельные коэффициенты погашения для соединений с сопряженными двойными связями:			
диеновых			
триеновых			

Продолжение таблицы

1	2	3	4
тетраеновых			
пентаеновых			
Массовая доля полиненасыщенных жирных кислот, %:			
линолевой			
линоленовой			
арахидоновой			

В заключении по работе дают сравнительную оценку биологической ценности пищевых животных жиров.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ГЛАВА 5. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ МЯСОПРОДУКТОВ

Физико-химические изменения, происходящие во время копчения, связаны с обезвоживанием продукта, насыщением тканей компонентами дыма, ферментативными процессами, а также тепловым воздействием.

Высокая химическая активность отдельных компонентов коптильного дыма и наличие реакпионноспособных функциональных групп и, прежде всего белковых составляющих мясопродуктов, обуславливают возникновение разнообразных химических реакций между коптильными веществами и составными частями мясопродуктов. Это приводит к образованию характерных свойств и некоторому консервированию продукта.

Процесс копчения сопровождается одновременно тепло-, массообменом, в результате чего изделия обезвоживаются, повышается a_w, что задерживает рост микрофлоры и способствует формированию органолептических показателей.

Копчение при высокой температуре сопровождается разной степенью денатурации белков, в результате чего освобождаются скрытые функциональные группы, а также уменьшается водосвязующая способность тканей, продукт лучше обезвоживается и уплотняется. Наиболее сильные изменения при копчении претерпевает коллаген.

Биохимические изменения при копчении, связанные с действием тканевых и микробиальных ферментов, определяются видом продукта и температурой копчения.

Образование признаков копченых изделий

С технологической точки зрения влияние копчения на свойства готовой продукции проявляется в нескольких направлениях:

– образование цвета копченого продукта с широким спектром оттенков от светло-желтого до темно-коричневого;

– появление специфического приятного аромата и вкуса копчености, обусловленных образованием в продукте соответствующих вкусо-ароматических веществ;

– упрочнение поверхности (образование вторичной оболочки);

– консервирование за счет антиокислительного, бактерицидного и антипротеолитического действия коптильных компонентов.

Отрицательное действие копчения прежде всего связано с попаданием в продукт ПАУ и излишних количеств формальдегида, метанола и некоторых фенолов.

Уменьшение пищевой ценности продуктов при копчении связано со снижением содержания аминокислот (на 10–20 %), вступающих в реакции с коптильными компонентами. При этом потери незаменимых аминокислот составляют 10–50 %, особенно чувствителен к копчению лизин.

Образование цвета. Окрашивание поверхности копченых изделий в коричневые или золотистые тона является не только неотъемлемой частью эффекта копчения, придающего готовому продукту приятный и привычный для потребителя внешний вид, но и служит в определенной степени критерием правильности осуществления самого процесса. Интенсивность окрашивания является показателем степени прокопченности обрабатываемого изделия.

Химические стороны эффекта окрашивания сложны и многообразны. В основе образования цвета копченостей лежат следующие процессы:

– осаждение окрашенных коптильных веществ;

– окисление, полимеризация компонентов дыма как на поверхности продукта, так и в воздушной среде;

– взаимодействие компонентов дыма с белковыми веществами продукта.

Кроме того, формирование цвета копченого продукта при высокотемпературном и горячем копчении идет и под действием высоких температур среды, интенсифицирующих все цветообразующие реакции. Поэтому изделия данной группы окрашены, как правило, в темно-коричневые тона.

Окрашенными коптильными компонентами являются вещества смолистой фракции дыма, а также некоторые другие, имеющие коричневые оттенки: фенолы, карбонилы, углеводы.

Оттенок цвета зависит от вида используемой древесины для получения коптильного дыма. Увеличение концентрации кислорода в зоне горения способствует более интенсивному окрашиванию продуктов.

Важнейшие процессы, влияющие на окрашивание поверхности продукта – реакции взаимодействия коптильных веществ с ингредиентами продуктов. С аминогруппами белковых веществ реагируют преимущественно карбонильные соединения дыма с образованием меланоидинов – азотсодержащих полимеров коричневого цвета. В цветообразовании принимают участие также формальдегид, гликолевый альдегид, глиоксаль, метилглиоксаль, ацетол, диацетил, фурфурол.

Из фенолов наиболее активное участие принимают те, которые содержат карбонильную группу, например, ванилин, конифериловый и синаповый альдегиды, а также полифенолы. Окрашивание усиливается в результате реакций карамелизации углеводов, образующихся при распаде целлюлозы и гемицеллюлозы.

Индивидуальные аминокислоты, реагируя с карбонильными соединениями, дают окраску различных оттенков. Например, при взаимодействии метилглиоксаля с лизином появляется коричневая окраска, с глицином – желтая с оранжевым оттенком, с метионином и валином, лейцином и некоторыми другими – желтая.

Скорость реакций Майяра увеличивается с увеличением pH среды, поэтому искусственное смещение pH среды в щелочную сторону интенсифицирует цветообразование при копчении. Использование влажной древесины при дымогенерации приводит к существенному ухудшению окраски поверхности мясных продуктов, что может быть объяснено образованием большого количества кислот, которые, попадая на поверхность продукта, снижают pH.

Цвет копченостей во многом определяется видом изделия, его структурой и химическим составом. Изделия с большим содержанием жира имеют лучший блеск.

Усилению цвета способствуют протеолитические процессы, поэтому соленое, прошедшее стадию созревания сырье, окрашивается интенсивнее.

Реакции цветообразования продолжают протекать некоторое время и после окончания процесса копчения. Окрашивающий эффект копчения фиксируется органолептически и инструментально – с использованием объективных цветовых характеристик.

Образование аромата и вкуса. Характерные вкусоароматические свойства копченых продуктов являются результатом совокуп-

ного действия сорбирующихся компонентов дыма и веществ, образующихся в результате реакций компонентов дыма друг с другом и с составляющими продукта.

Аромат коптильного дыма зависит от вида древесины, температуры тления, типа дымогенератора, степени дисперсности и химического состава дыма. Считается, что наиболее ароматные компоненты содержатся в газообразной фазе дыма. Аромат коптильного дыма обеспечивают представители многих классов органических веществ, но основную долю вносят фенолы и их производные.

Установлено, что «ключевыми» компонентами в композиции являются следующие вещества: гваякол, метилгваякол, пирокатехин, сирингол, ванилин, эвгенол, крезол, циклотен. Кроме того, на запах и вкус влияют вещества, летучие с водяным паром – альдегиды, кетоны, фенолы и органические кислоты.

Механизм формирования вкусоароматических веществ при диффузии коптильных компонентов в продукт неизвестен. Ведущую роль в этом отводят фенолам, особенно гваяколу, сирингулу и их производным. Считается, что в среднем около 75 % фенольных веществ по мере их диффузии в продукт вступают в различные реакции с белковыми и жировыми компонентами продукта. При этом вкусоароматические ощущения во многом зависят от консистенции продукта, а также от его химического состава, в частности соотношения в нем липидов, белков, влаги и соли.

Аромат и вкус копченых изделий изменяются в процессе их производства и хранения. Сразу после обработки дымом копченый продукт имеет явно выраженный запах и привкус дыма. Через сравнительно короткий промежуток времени запах и привкус ослабевают вследствие десорбции с поверхности продукта легколетучих компонентов дыма, а также в результате взаимодействия с кислородом воздуха и продуктом.

Образование вторичной оболочки. Упрочение поверхностных слоев продукта при копчении обусловлено образованием полимерных веществ и формированием так называемой вторичной оболочки, которая способствует повышению стойкости изделия при хранении.

Наиболее сильное дубящее действие на коллаген и другие белки животных тканей оказывает формальдегид и некоторые другие альдегиды. Упрочение белковых структур происходит в результате формальдегид – коллагеновой конденсации.

Образующиеся – CH_2 – мостики между молекулами коллагена приводят к уплотнению последних. Белки становятся менее активными и более устойчивыми к действию протеаз, возрастают их прочностные свойства, резко снижается гидрофильность. Эффект дубления имеет положительное значение для кишечной оболочки и поверхностного слоя продукта, защитные свойства которого к диффузии высокомолекулярных ПАУ и бактерий повышаются. Вторичная оболочка сохраняет форму продукта, способствует формированию структуры.

Восстановление консистенции продукта возможно при обработке вторичной оболочки водой или паром, что приводит к распаду формальдегидно-коллагеновых волокон.

Дубление белков несколько снижает их переваримость. Некоторое упрочение поверхностных слоев происходит и в результате удаления влаги с поверхности продукта при копчении.

Положительный эффект обезвоживания связан со стандартизацией влаги в продукте, нежелательный – с неравномерностью ее распределения по слоям и возможной деформацией изделия.

Контрольные вопросы

1. С чем связаны физико-химические изменения при тепловой обработки?
2. Опишите признаки копченых изделий.
3. Какие процессы лежат в основе образования цвета копченостей?
4. Опишите механизм образования аромата и вкуса при термической обработке.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛОВ В КОПЧЕНЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

Цель и задачи работы: освоить методы качественного обнаружения и количественного определения суммарных фенолов в колбасных и копченых изделиях.

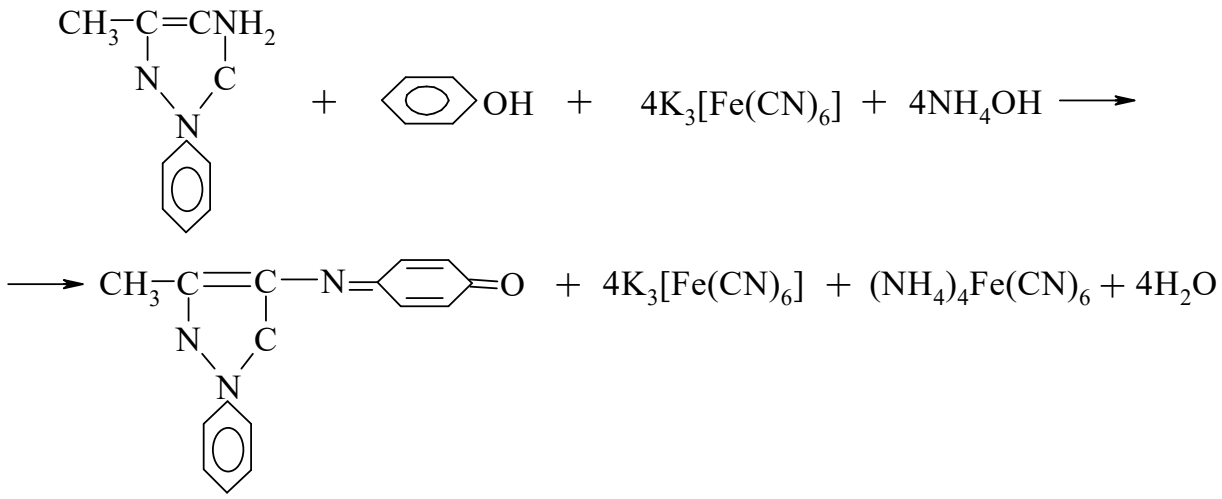
Методические указания.

Фенольные соединения обладают токсическим и даже канцерогенным действием, в связи с чем накопление их в пищевых продуктах должно быть сведено до минимума. Для гарантии экологической чистоты пищевых продуктов необходимо строго контролировать содержание фенолов.

При копчении фенолы вначале интенсивно накапливаются в поверхностном слое. В дальнейшем проникновение их в колбасу значительно замедляется. Одновременно происходит диффузия фенольных компонентов дыма во внутренние слои колбасы. На последней стадии копчения и сушки количество фенольных соединений в поверхностном слое уменьшается почти наполовину и заметно возрастает во всех внутренних слоях колбасного батона. Фронт проникновения фенольных соединений внутрь колбасного батона тесно связан с химическим составом и технологическими режимами производства продуктов и характеризует качество копчения. Например, фенолы хорошо растворяются в жире, в жировой ткани их в 1,5 раза больше, чем в мышечной. В процессе холодного копчения в копченостях накапливается в среднем 15 мг% (9–24 мг%) фенолов.

При изучении вопроса о скорости и характере проникновения фенолов в колбасные изделия удобно пользоваться методом отпечатков, разработанным сотрудниками кафедры аналитической химии Воронежской государственной технологической академии, который основан на развитии качественной реакции фенолов в присутствии карбоната натрия и специального проявителя.

Количественное определение фенолов в колбасных изделиях проводят одним из колориметрических методов. Суммарное определение содержания фенолов основано на измерении оптической плотности окрашенного раствора, цветность которого возникает в результате качественной реакции:



Другой метод суммарного определения содержания фенолов основан на получении нитрозосоединений при взаимодействии фенола с нитритом натрия. Нитрозосоединение образует с избытком аммиака окрашенный в желтый цвет продукт реакции, который определяют фотоэлектроколориметрически.

Объекты исследования: копченые колбасные изделия различного группового ассортимента или копчености.

Материалы, реактивы, оборудование: раствор ацетона с массовой долей 50 %; раствор с массовой долей тетрабората натрия 0,5 %; раствор с массовой долей 4-аминоантипирина 2 %; раствор с массовой долей железистосинеродистого калия 8 %; гваякол (для построения калибровочного графика); раствор с массовой долей персульфата аммония 20 %; раствор с массовой долей карбоната натрия 1 %; проявитель; фильтровальная бумага; дистиллированная вода; фотоэлектроколориметр ФЭК-56М или КФК-2, кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 и 3 см, светофильтры λ = 400 нм, λ = 510 нм; мерные колбы вместимостью 50 см^3; мерный цилиндр вместимостью 150 см^3; пипетки вместимостью 1, 5, 10 см^3; колориметрические пробирки; коническая колба вместимостью 250 см^3; стеклянная палочка; бумажный фильтр «синяя лента»; весы технические, вибровстряхиватель; гидроксид натрия NaOH, водный раствор (0,1 моль/дм^3); серная кислота H_2SO_4, раствор с массовой долей 25 %; сульфат цинка $ZnSO_4$, водный раствор с массовой долей

0,45 %; нитрит натрия $NaNO_2$, свежеприготовленный водный раствор с массовой долей 0,5·%; гидроксид аммония NH_4OH_4, раствор с массовой долей 10 %; стандартный водный раствор фенола (С = 1 мг/см^3).

Подготовка проб

Образцы продуктов (не менее 500 г) дважды измельчают на мясорубке.

Ход работы

Перед собственно определением фенолов в копченых изделиях проводят органолептическую оценку продуктов. При этом осматривают поверхность колбасного батона, отмечают вид колбасной оболочки, групповой ассортимент и наименование колбасы (с помощью преподавателя). Путем визуальной оценки устанавливают цвет, состояние поверхности на разрезе, запах, вкус. Данные фиксируют в таблице результатов.

1. Определение границ проникновения фенолов

Полученный со среза копченой колбасы отпечаток проникших фенолов должен быть видимым и отличаться по цвету от фона предварительно подготовленной фильтровальной бумаги. Подготовленную фильтровальную бумагу опрыскивают из пульверизатора проявителем и плотно прижимают к срезу колбасного батона. Спустя 20–30 с бумагу отделяют от поверхности среза колбасы и опрыскивают раствором персульфата аммония с массовой долей 20 %. Через 2 мин на бумаге образуется отчетливый, окрашенный в розовый цвет отпечаток границ проникновения фенолов. Отпечаток зарисовывают, измеряют с точностью до 0,1 мм границы проникновения или аккуратно вырезают отпечаток ножницами и включают в таблицу результатов.

2. Количественное определение фенолов в колбасных изделиях.

Колориметрический метод на основе цветной реакции с 4-аминоантипирином и железосинеродистым калием

Навески измельченных колбас 3,000–5,000 г помещают в малый сосуд гомогенизатора, заливают раствором с массовой долей ацетона 50 % в соотношении 1 : 4 (по объему) и гомогенизируют в течение

5 мин, а затем фильтруют. К 5 см^3 прозрачного раствора добавляют 20 см^3 раствора с массовой долей тетрабората натрия 0,5 %, 0,5 см^3 раствора 4-аминоантипирина с массовой долей 2 % и 0,25 см^3 раствора железосинеродистого калия с массовой долей 8 %. Все реагенты перемешивают и по истечении 15 мин измеряют интенсивность окраски (оптическую плотность) на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Параллельно готовят контрольную пробу, в которой вместо исследуемого фильтра используют 5 см^3 раствора с массовой долей ацетона 50 %.

Содержание суммарных фенолов (x, мг/100 г) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{b \cdot 100 \cdot a}{c \cdot m}, \qquad (36)$$

где x – содержание суммарных фенолов, мг/100 г;
a – содержание фенолов в 5 см^3 окрашенного раствора, определенное по градуировочному графику;
b – объем ацетонового экстракта, см^3;
100 – коэффициент пересчета на 100 г продукта;
c – объем взятого для анализа фильтрата, см^3;
m – масса навески продукта, г.

Колориметрический метод на основе получения нитрозосоединений при взаимодействии фенола с нитритом натрия

В коническую колбу помещают 15,00 г копченой колбасы, добавляют 50 см^3 дистиллированной воды, закрывают пришлифованной стеклянной или корковой пробкой и встряхивают на вибровстряхивателе 15 мин. Содержимое конической колбы фильтруют в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки. Для осаждения белков 10 см^3 полученного раствора переносят в колориметрическую пробирку, добавляют пипеткой 4 см^3 раствора $ZnSO_4$ с массовой долей 0,45 %, 1 см^3 раствора NaOH молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 и выдерживают 5 мин на водяной бане при температуре кипения, после чего раствор фильтруют. В колориметрическую пробирку помещают 5 см^3 фильтрата, добавляют 0,25 см^3 раствора H_2SO_4 с массовой долей 25 % и 2,5 см^3 раствора $NaNO_2$ с массовой долей 0,5 %. Содержимое пробирки нагревают 5 мин на водяной бане, охлаждают и добавляют 5 см^3 раствора NH_4OH с массовой

долей 10 %. Оптическую плотность окрашенного в желтый цвет раствора измеряют на фотоэлектроколориметре при λ = 400 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 3 см. Содержание фенола в пробе определяют по калибровочному графику, построенному по стандартным растворам фенола.

Содержание фенолов (x, мг%) рассчитывают по формуле:

$$x = c \cdot 50/m \cdot 100, \qquad (37)$$

где c – концентрация фенолов в водной вытяжке, найденная по градуировочному графику, мг/см^3;

50 – объем водной вытяжки, см^3;

m – масса навески продукта, г.

Оформление результатов

Полученные результаты сводят в таблицу вида:

Групповой ассортимент	Органолептические показатели				Суммарное содержание фенолов, мг/100 г	Границы проникновения фенолов (отпечатки)
	Цвет	Запах	Вкус	Вид оболочки, состояние и окраска поверхности		
Полукопченые						
Варено-копченые						
Сырокопченые						

На основании полученных результатов студенты самостоятельно формулируют выводы и делают общее заключение по работе с учетом отмеченных органолептических показателей и количественного содержания фенольной фракции в мясных продуктах.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2
ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕНЗАПИРЕНА В КОПЧЕНЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

Цель и задачи работы: освоить методы качественного и количественного определения полициклических ароматических углеводородов (бензапирена) в копченых мясных продуктах на основе флуоресцентно-спектральных методов.

Методические указания

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) присутствуют в продуктах растительного происхождения, копченых колбасах и копченостях. Одних из наиболее известных представителей ПАУ является бензапирен (БП), содержание которого в копченых и полукопченых колбасах колеблется от 1 мкг до нескольких десятков мкг на 1 кг продукта, а в вареных – от 0,2–0,3 до 1,0 мкг/кг.

Для количественного определения канцерогенных ПАУ в пищевых продуктах широкое применение нашли люминесцентные методы исследования. Определение БП и других канцерогенных ПАУ проводится по тонкой структуре спектра флуоресценции при низкой температуре.

Спектрально-флуоресцентный метод определения БП включает несколько этапов: извлечение из навески продукта фракции, содержащей ПАУ; очистку полученной фракции от примесей и хроматографическое разделение ПАУ; качественное определение БП и других ПАУ по спектрам люминесценции при температуре жидкого азота; количественное определение БП с помощью одной из модификаций спектрально-флуоресцентного способа (методом добавок или методом внутреннего стандарта).

При выполнении всех этапов выделения, очистки и фракционирования ПАУ предел чувствительности метода составляет 0,1–0,2 мкг/кг. Погрешность опыта ± 10–15 %.

Качественное определение БП проводят спектральным методом с использованием эффекта Э.В. Шпольского. При температуре минус 196 °С получают спектры люминесценции отдельных фракций ПАУ, растворенных в нормальных парафиновых углеводородах. Спектры имеют тонкую структуру и называются квазилинейчатыми.

О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я : колбасные изделия различного группового ассортимента: вареные, варено-копченые, полукопченые, сырокопченые, а также копчености.

Материалы, реактивы, оборудование: этиловый спирт; этиловый эфир; дистиллированная вода; безводный Na_2SO_4; окись алюминия; бензол; колонка стеклянная длиной 120–140 мм; хроматографическая колонка (или пластинка); петролейный эфир; смесь хлороформ-петролейный эфир (1 : 2); н-октан; жидкий азот; сосуд Дьюара; ртутно-кварцевая лампа ДРШ-250, ДРШ-50 (или ПРК-2); фильтр УФС-1 (или УФС-2); спектрограф ИСП-51; эталонное вещество (1,12 бензперилен), чистый БП; мясорубка.

Подготовка проб

Из копченого продукта предварительно готовят фарш путем измельчения на мясорубке. К 1 кг фарша копченого продукта приливают 1 $дм^3$ этилового спирта, добавляют 150–250 г КОН (в зависимости от содержания жиров в продукте) и кипятят 1,5–2 ч для омыления липидов. Затем приливают 3–5-кратный объем дистиллированной воды и экстрагируют неомыляемые вещества этиловым эфиром. Первая порция эфира должна быть в 4–5 раз больше объема обрабатываемого раствора. Последующие три-четыре порции эфира должны быть в 3 раза больше первой.

Эфирный экстракт несколько раз промывают дистиллированной водой, первую порцию воды подкисляя, потом сушат над безводным Na_2SO_4. Эфир отгоняют, остаток растворяют в бензоле и пропускают через колонку длиной 120–140 мм, заполненную окисью алюминия. Адсорбированные в колонке ПАУ, отделенные от других неомыляемых веществ, элюируют бензолом до тех пор, пока не прекратится выделение фракции с синей флуоресценцией. Бензол отгоняют из элюата, а остаток фракционируют колоночной или тонкослойной хроматографией.

Выделенную смесь ПАУ, содержащую некоторые примеси, растворяют в 10–15 $см^3$ петролейного эфира и наносят на заполненную окисью алюминия колонку диаметром 10–14 мм и высотой 120–140 мм. Элюируют флуоресцирующие фракции ПАУ сначала петролейным эфиром, затем с добавлением бензола. БП содержится в III, IV или V фракциях. Для более четкого отделения БП можно

повторить фракционирование колоночным методом или в тонком слое окиси алюминия. При использовании второго метода растворителем служит смесь хлороформ-петролейный эфир (1 : 2).

Ход работы

1. Качественное определение БП.

Для качественного определения БП используют смесь, состоящую из 1 $см^3$ бензольного экстракта и 2 $см^3$ н-октана. Пробирку со смесью помещают в сосуд Дьюара с жидким азотом. Возбуждают люминесценцию с помощью ртутно-кварцевой лампы ДРШ-250, ДРШ-50 или ПРК-2, пропуская УФ-излучение через фильтр УФС-1 или УФС-2. При определении только БП (если другие фракции ПАУ не интересуют) можно пользоваться также УФС-3 или УФС-4. Для записи спектра обычно используют спектрограф ИСП-51 с камерой $f = 270$ мм. В спектре замороженного н-октанового раствора БП имеются характерные квазилинии 403,0 и 408,5 нм.

2. Количественное определение БП.

Количественное определение БП проводят с помощью флуоресцентно-спектрального метода. Оно может быть выполнено с использованием одной из двух модификаций: с помощью добавок и установкой прибора по фону, создаваемому люминесцирующими примесями, содержащимися в исследуемом экстракте; с помощью внутреннего стандарта.

При определении БП с помощью первой из указанных модификаций исследуемый раствор сравнивают не с раствором чистого БП, а с таким же исследуемым, но сильно разбавленным раствором с добавлением в него определенного количества чистого БП (массовый излишек), на свечение которого так же влияют посторонние вещества, как и в исследуемом растворе.

При определении БП с помощью внутреннего стандарта в бензапиреновую фракцию вводят чистое эталонное вещество, дающее хороший квазилинейчатый спектр в аналогичных условиях, причем в спектре этого вещества не должно быть линий, перекрывающихся с аналитическими линиями БП. Таким веществом-стандартом обычно служит 1,12-бензперилен. В спектре Шпольского н-октанового раствора 1,12-бензперилена есть четкая линия 406,3 нм, располагающаяся между соответствующими линиями БП, а вблизи аналитических линий БП в спектре 1,12-бензперилена заметные линии

отсутствуют. Вещество-стандарт вводится для сравнения и в эталонные растворы БП. В исследуемом растворе измеряют отношение интенсивности линии БП и добавленного вещества. Пользуясь ранее определенным по растворам-«свидетелям» отношением интенсивности линий для известных концентраций БП и вещества-стандарта и зная количество добавленного стандарта, находят количество БП в бензапиреновой фракции, выделенной из продукта.

Оформление результатов

Полученные результаты сводят в таблицу вида:

Групповой ассортимент колбасных изделий	Содержание бензапирена, мкг/кг
Вареные	
Полукопченые	
Варено-копченые	
Сырокопченые	

Анализируют полученные данные и формулируют выводы, дают санитарно-гигиеническую оценку копченых мясных продуктов.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ

Цель и задачи работы: освоить методы и количественно определить нитраты и нитриты в мясе, вторичных продуктах убоя скота, мясных изделиях на основе ионометрического и фотометрического методов.

Методические указания

Среди перечня токсических и вредных веществ, обнаруживаемых в сырье и продуктах, большое практическое значение имеет определение нитрат- и нитрит-ионов, источниками которых служат корма животных и собственно нитрит, добавляемый для цветообразования при производстве мясопродуктов.

Проблема производства экологически чистых продуктов питания связана с реализацией инструментальных методов контроля вредных веществ, применимых в условиях производства и имеющих достаточную точность и экспрессность. Существующие фотоколориметрические, хроматографические, спектрофотометрические и химические методы определения нитратов и нитритов не отвечают в полной мере требованиям и условиям производственных лабораторий. Методики имеют ряд недостатков: длительность, использование токсичных и дефицитных реактивов, дорогостоящей аппаратуры, определенный уровень требований к квалификации оператора для выполнения работ и т. д. Ряд преимуществ имеет ионно-селективный метод определения нитрат- и нитрит-ионов ввиду ряда достоинств, прежде всего связанных с малой продолжительностью, точностью и простотой определения, а также компактностью приборов.

В зависимости от уровня материальной базы, в аналитической практике могут быть применены те или иные методы. Принципы и основная суть их изложены ниже:

Ионометрический метод определения нитрат- и нитрит-ионов предусматривает использование ионоселективного (нитратного) электрода типа ЭМ-Л$О_3$-01 путем индикации и измерения ЭДС электрода на ионометре И-130 (или нитратомере). Иономер предназначен для измерения активности ионов водорода (pH), одно-

валентных и двухвалентных анионов и катионов (pX), окислительно-восстановительных потенциалов в цифровой форме и в виде сигналов постоянного тока. Содержание нитрат-ионов можно фиксировать без предварительного измерения pH. На точность измерения не влияет присутствие фосфора, белков, жиров. Не рекомендуется проводить определение в объектах, содержащих хлорид натрия в массовых концентрациях более 3,5 %.

Измерение ЭДС и определение концентрации нитратов проводят в водной вытяжке из пробы мясопродукта после предварительной экстракции при интенсивном перемешивании смеси с последующим фильтрованием.

Для исследования растворов, имеющих малые концентрации нитрат- и нитрит-ионов, используют метод добавок: в 50 $см^3$ вытяжки измеряют ЭДС, затем в нее вводят нитрат калия так, чтобы массовая концентрация нитрата увеличилась до значений, соответствующих предварительно построенному калибровочному графику. По разнице значений рассчитывают искомую величину.

Для определения содержания нитритов их окисляют персульфатом аммония до нитратов. Разность между найденным суммарным содержанием нитрат-ионов и начальной концентрацией нитрат-ионов равна концентрации нитрит-ионов.

Фотометрические методы применяют в ряде модификаций, каждая из которых имеет практическое значение в анализе мясопродуктов и основана на той или иной химической реакции с образованием специфически окрашенных растворов. Например, применяется метод, основанный на реакции нитрита с N-(1-нафтил)-этилендиамин дигидрохлоридом и сульфаниламидом в обезбелоченном фильтрате с последующим фотометрированием или визуальным определением интенсивности окраски. При фотоколориметрическом определении интенсивности окраски метод соответствует международному стандарту и применяется при разногласиях в оценке.

Используют также метод, основанный на реакции нитрита с реактивом Грисса (смесь растворов сульфаниловой кислоты и α-нафтиламина в уксусной кислоте) в обезбелоченном фильтрате с последующим измерении интенсивности окраски на фотоколориметре.

Объекты исследования: мясо разных видов убойных животных и птицы; субпродукты I и II категории, колбасные изделия, продукты из свинины, говядины, баранины, мяса птицы; консервы, при изготовлении которых применяют нитрит натрия.

Материалы, реактивы, оборудование: 1. Ионометр И-130 или нитратомер; ионоселективный электрод на NO_3-ионы; электрод сравнения – хлорсеребряный; весы технические и аналитические; конические колбы вместимостью 250 $см^3$; химические стаканы вместимостью 50 $см^3$; мерный цилиндр вместимостью 100 $см^3$; мерная колба вместимостью 1 $дм^3$; пипетки вместимостью 5 и 10 $см^3$; нитрат калия, ч. д. а.; водный раствор сульфата цинка с массовой долей 0,45 %; водный раствор сульфата калия с концентрацией (1/2 K_2SO_4) 1 моль/$дм^3$; водный раствор гидроксида натрия NaOH, (0,1 моль/$дм^3$); водный раствор персульфата аммония $(NH_4)S_2O_3$ с массовой долей 8 %.

2. Мясорубка бытовая или электрическая бытовая с отверстиями решетки диаметром от 3 до 4 мм; весы лабораторные; баня водяная; колбы мерные вместимостью 100, 200, 250, 500 и 1000 $см^3$; воронки стеклянные; фильтры беззольные бумажные; фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; пипетки вместимостью 2; 5; 10 и 25 $см^3$; калий железистосинеродистый, ч.д.а.; цинк уксуснокислый, ч. д. а.; кислота уксусная, х. ч.; натрий тетраборнокислый (бура), ч. д. а.; натрий азотистокислый, ч. д. а.; кислота соляная, ч. д. а., плотностью 1,19 г/$см^3$; амид сульфаниловой кислоты; N-(1-нафтил) этилендиамин дигидрохлорид; вода дистиллированная; пробирки стеклянные; колбы конические вместимостью 100 $см^3$; воронки; цилиндры вместимостью 50 $см^3$; стаканы вместимостью 50, 100 и 250 $см^3$; фильтры обеззоленные бумажные; раствор уксусной кислоты с (CH_3COOH) = 2,0 моль/$дм^3$; раствор соляной кислоты с (HCl) = 0,1 моль/$дм^3$; водный раствор аммиака с концентрацией – 3,0 моль/$дм^3$; кислота сульфаниловая безводная, ч. д. а. (или х.ч.); α-нафтиламин, х. ч.; раствор гидроксида натрия с (NaOH) = 0,1 моль/$дм^3$; раствор сульфата цинка концентрацией 4,5 г/$дм^3$; пыль цинковая; вата медицинская; гомогенизатор; кристаллизатор; колонка стеклянная редукционная; цинк металлический гранулированный; кислота уксусная ледяная; натрий тетраборнокислый

(бура); сульфат кадмия; раствор с (HCl) = 0,1 моль/дм^3; натрия этилендиамин уксусной кислоты (трилон Б); натрий азотнокислый; амид сульфаниловой кислоты; калий азотнокислый; реактив Карреза I; реактив Карреза II; насыщенный раствор буры; растворы 1 и 2; реактив Грисса.

Подготовка проб

С колбасных изделий снимают оболочку; с фаршированных колбас и языков в шпике – поверхностный слой шпика и оболочку; с окороков, лопаток, рулетов, корейки и грудинки – поверхностный слой шпика; затем пробы дважды измельчают на мясорубке с отверстиями решетки диаметром от 3 до 4 мм. Продукты, состоящие из шпика с промежуточными слоями мышечной ткани (ветчина в форме, прессованный бекон и аналогичные им) измельчают полностью.

Полученный фарш тщательно перемешивают, помещают в стеклянную или пластмассовую банку вместимостью от 200 до 400 см^3, заполнив ее, и закрывают крышкой. Пробу хранят при (4 ± 2) °С до окончания анализа. Анализ проводят не позднее чем через 24 ч после отбора проб. Пробу сырых продуктов анализируют сразу после измельчения.

Ход работы

1. Ионометрический метод определения нитрат- и нитрит-ионов

Для определения нитрат-ионов в коническую колбу вместимостью 250 см^3 помещают навеску мясопродукта с массой 10–20 г (погрешность 0,01 г), добавляют 100 см^3 дистиллированной воды (подогретой до 50…60 °С) и экстрагируют нитраты в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Содержимое колбы охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр в коническую колбу. В полученном мутном растворе осаждают белки. Для этого добавляют к фильтрату 2,5 см^3 раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 и 10 см^3 раствора сульфата цинка с массовой долей 0,45 %, нагревают 5 мин на водяной бане при температуре кипения, охлаждают колбу и раствор фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат и промывные воды после промывания осадка белков на фильтре собирают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и

доводят объем до метки раствором сульфата калия молярной концентрацией 1 моль/дм^3. В прозрачном фильтрате измеряют ЭДС, по величине которой находят начальное содержание нитрат-ионов в растворе по градуировочному графику.

Для определения нитрит-ионов их окисляют персульфатом аммония до нитратов. К 25 см^3 фильтрата добавляют 0,5 см^3 раствора персульфата аммония с массовой долей 8 %, энергично перемешивают и через 5 мин измеряют ЭДС, по величине которой находят концентрацию нитрат-ионов после окисления нитрит-ионов, используя градуировочный график. Разность между найденным суммарным содержанием нитрат-ионов и начальной концентрацией нитрат-ионов равна концентрации нитрит-ионов, содержащихся в исследуемом растворе.

Содержание нитрат-ионов (x, мг%) в мясе и мясопродуктах находят по формуле

$$x = \frac{62 \cdot C \cdot 100}{m} \cdot 100, \qquad (38)$$

где 62 – молярная масса эквивалента нитрат-ионов, г/моль;

C – концентрация нитрат-ионов до окисления, найденная по градуировочному графику, моль/дм^3;

100 – объем фильтрата, см^3;

m – навеска измельченного мяса, г.

Содержание нитрит-ионов (X_2, мг%) в мясе и мясопродуктах находят по формуле

$$x_2 = \frac{46(C_1 - C) \cdot 100}{m} \cdot 100, \qquad (39)$$

где C_1 – концентрация нитрат-ионов после окисления, найденная по градуировочному графику, моль/дм^3;

46 – молярная масса эквивалента нитрит-ионов, г/моль;

100 – объем фильтрата, см^3.

2. Фотометрическое определение нитритов и нитратов.

Метод определения нитритов и нитратов по реакции с N-(1-нафтил) этилендиамин дигидрохлоридом

Для количественного определения нитрита в мерную колбу вместимостью 200 см^3 помещают 10 г подготовленной к анализу пробы,

взвешенной с погрешностью не более 0,001 г, добавляют последовательно 5 см^3 насыщенного раствора буры и 100 см^3 воды температурой (75 ± 2) °С.

Колбу с содержимым нагревают на водяной бане 15 мин при температуре кипения, периодически встряхивая, затем охлаждают до (20 ± 2) °С и, тщательно перемешивая, последовательно добавляют по 2 см^3 реактива Карреза 1 и реактива Карреза 2, доводят до метки и выдерживают 30 мин при (20 ± 2) °С. Затем содержимое колбы фильтруют через складчатый фильтр.

В полученном обезбелоченном фильтрате определяют содержание нитрита (x_1, %) и нитрата (x_2, %).

Для определения содержания нитрита фильтрат вносят объемом не более 20 см^3 пипеткой в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и проводят цветную реакцию и фотометрирование аналогично операциям при построении градуировочного графика, используя вместо стандартных растворов 10 см^3 обезбелоченного фильтрата.

Параллельно проводят контрольный опыт на реактивы, помещая в мерную колбу вместимостью 200 см^3 вместо 10 см^3 пробы 10 см^3 воды.

Если полученная оптическая плотность превышает максимальную оптическую плотность на градуировочном графике, то цветную реакцию проводят с меньшим объемом фильтрата.

При определении нитратов используют специальную редукционную колонку. Дно редукционной колонки, имеющей поперечное сечение 7 мм, воронкообразное расширение (d = 20 мм), пришлифованный кран внизу и капилляр (d = 3 мм) покрывают тонким слоем стеклянной ваты, предварительно смоченной водой. Колонку заполняют водой и промытым губчатым кадмием на высоту 170 мм. Слой кадмия во время заполнения периодически перемешивают стальной проволокой, чтобы в колонке не оставалось пузырьков воздуха.

Скорость потока жидкости из колонки не должна превышать 3 см^3/мин.

Перед употреблением редукционную колонку промывают последовательно 25 см^3 раствора соляной кислоты, 50 см^3 воды и 25 см^3 разбавленного 1 : 9 аммонийного буфера. Уровень жидкости всегда должен быть выше кадмия.

Восстановительную способность редукционной колонки проверяют, используя вместо испытуемого обезбелоченного фильтрата стандартный раствор нитрата калия. Если концентрация нитрита в растворе по градуировочному графику будет ниже 0,9 мкг нитрита в 1 $см^3$ (т. е. 90 % теоретического значения), то редукционную колонку нельзя использовать для анализа. Необходимо кадмий перенести в химический стакан и залить на ночь раствором соляной кислоты молярной концентрацией 0,1 моль/$дм^3$, промыть его водой и повторить операции по подготовке колонки.

При проведении анализа 10 г подготовленной к анализу пробы, взвешенной с погрешностью не более 0,001 г, помещают в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$. В колбу с навеской добавляют последовательно 5 $см^3$ насыщенного раствора буры и 100 $см^3$ воды с температурой (75 ± 2) °С.

Колбу с содержимым нагревают на водяной бане при температуре кипения 15 мин, периодически встряхивая, затем охлаждают до (20 ± 2) °С и, тщательно перемешивая, последовательно добавляют по 2 $см^3$ реактива Карреза 1 и реактива Карреза 2, затем доводят до метки и выдерживают 30 мин при (20 ± 2) °С. Затем содержимое колбы фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Параллельно проводят контрольный анализ на реактивы, помещая в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$ вместо испытуемой пробы 10 $см^3$ воды.

Для определения содержания нитрата 20 $см^3$ фильтрата пипеткой наливают в резервуар колонки и сразу же добавляют 5 $см^3$ аммонийного буфера.

Вытекающий из колонки раствор собирают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, промывая колонку водой. Затем доводят уровень жидкости до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят не более 20 $см^3$ полученного из колонки раствора и доливают водой до объема не более 60 $см^3$. Добавляют 10 $см^3$ раствора 1 и 6 $см^3$ раствора 2 для проведения цветной реакции. Раствор перемешивают и выдерживают в темном месте при (20 ± 2) °С 5 мин. Затем добавляют 2 $см^3$ раствора 3 для проведения цветной реакции, перемешивают и ставят в темное место на 3 мин. Доводят раствор до метки, перемешивают

и измеряют интенсивность красной окраски раствора на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром или спектрофотометре при длине волны 538 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см в отношении контрольного раствора.

Если оптическая плотность окрашенного раствора превышает максимальное значение оптической плотности по градуировочному графику, то цветную реакцию проводят с меньшей порцией раствора.

Массовую долю нитрита (x_1, %) вычисляют по формуле:

$$x_1 = \frac{M_1 \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V \cdot 10^6}; \qquad (40)$$

где M_1 – массовая концентрация нитрита натрия, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3;

m – навеска продукта, г;

V – объем фильтрата, взятый для колориметрического определения, см^3;

10^6 – коэффициент перевода в граммы.

Визуальное определение предельно допустимого содержания нитритов

При визуальной оценке концентрации нитритов используют стандартный раствор, 1 см^3 которого содержит 2,5 мкг нитрита натрия. Для его приготовления 5 см^3 рабочего раствора нитрита натрия вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Для приготовления стандартных эталонов в семь мерных колб вместимостью по 100 см^3 пипеткой вносят следующие объемы раствора сравнения: в первую колбу – 2 см^3, во вторую – 4 см^3, в третью – 6 см^3, в четвертую – 7 см^3, в пятую – 8 см^3, в шестую – 10 см^3 и в седьмую – 11 см^3.

Последовательно в каждую колбу добавляют по 50 см^3 дистиллированной воды, 10 см^3 раствора 1 и выдерживают колбы в темном месте 5 мин. Затем добавляют по 2 см^3 раствора 2 и снова выдерживают в темном месте 3 мин, после чего объемы растворов в колбах доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Полученные растворы сравнения содержат соответственно 0,050; 0,100; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250 и 0,275 мкг азотистокислого натрия в 1 $см^3$ раствора.

В семь пробирок из бесцветного стекла одинакового диаметра наливают растворы сравнения нитрита натрия. (Внимание! Растворы не стойки, поэтому их готовят из основного раствора непосредственно перед определением).

Для определения предельно допустимого содержания нитрита в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят пипеткой 10 $см^3$ обезбелоченного фильтрата, последовательно добавляют 50 $см^3$ дистиллированной воды, 10 $см^3$ раствора 1 и выдерживают в темном месте 5 мин. Затем добавляют 2 $см^3$ раствора 2 и снова выдерживают в темном месте 3 мин, после чего объем раствора в колбе доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Испытуемый окрашенный раствор наливают в пробирку из бесцветного стекла, имеющую такой же диаметр, как и пробирка для раствора сравнения. Сравнение интенсивности окраски испытуемого раствора с окраской раствора сравнения производят визуально на фоне листа белой бумаги.

Массовая доля нитрита (%) при навеске пробы 10 г и объеме фильтрата 10 $см^3$ указана в таблице 9.

Таблица 9 – Массовая доля нитрита в образцах, %

Номера пробирок	Массовая концентрация нитрита в растворе сравнения, мкг/$см^3$	Массовая доля нитрита, %
1	0,050	0,0010
2	0,100	0,0020
3	0,150	0,0030
4	0,175	0,0035
5	0,200	0,0040
6	0,250	0,0050
7	0,275	0,0055

Массовую долю нитрита (x_2, %) при других разведениях вычисляют по формуле:

$$x_2 = \frac{E \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V \cdot 10^6}; \quad (41)$$

где E – массовая концентрация нитрита в 1 см^3 раствора сравнения, который по интенсивности окраски соответствует испытуемому раствору, мкг;

m – навеска продукта, г;

V – объем обезбелоченного фильтрата, взятый для исследования, см^3;

10^6 – коэффициент перевода в граммы.

Метод, основанный на реакции Грисса

Взвешивают 20 г подготовленной к анализу пробы с погрешностью не более 0,01 г, помещают в химический стакан, заливают 35–40 см^3 дистиллированной воды, нагретой до (55 ± 2) °С, и настаивают, периодически перемешивая, в течение 10 мин. Затем вытяжку фильтруют через ватный фильтр в мерную колбу вместимостью 200 см^3. Навеску несколько раз промывают и переносят на фильтр, где еще промывают водой, затем раствор охлаждают и доводят водой до метки.

Для приготовления вытяжки сырокопченых продуктов из свинины, баранины, говядины и сырокопченых колбас навеску 20 г заливают 200 см^3 предварительно отмеренной и нагретой до (55 ± 2) °С дистиллированной воды и настаивают, периодически помешивая, в течение 30 мин. Затем вытяжку фильтруют через ватный фильтр, не перенося осадка на фильтр.

20 см^3 вытяжки помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 10 см^3 раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 и 40 см^3 раствора сульфата цинка с массовой долей 0,45 % для осаждения белков. Смесь в колбе нагревают 7 мин на водяной бане при температуре кипения, после чего охлаждают, доводят до метки водой, перемешивают и фильтруют через обеззоленный бумажный фильтр.

Параллельно проводят контрольный анализ на реактивы, помещая в мерную колбу вместимостью 100 см^3 вместо 20 см^3 вытяжки 20 см^3 дистиллированной воды.

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 помещают 5 см^3 прозрачного фильтрата, полученного после осаждения белков, 1 см^3

раствора аммиака, 2 см^3 раствора соляной кислоты, 2 см^3 дистиллированной воды и, для усиления окраски, 5 см^3 раствора сравнения, содержащего 1 мкг нитрита натрия в 1 см^3. Затем в колбу приливают 15 см^3 реактива Грисса и через 15 мин измеряют интенсивность окраски на спектрофотометре при длине волны 538 нм или на фотоколориметре с зеленым светофильтром (№ 6) в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 2 см в отношении раствора сравнения.

Массовую долю нитрита (x, %) вычисляют по формуле:

$$x_5 = \frac{M_1 \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 30}{m \cdot 20 \cdot 5 \cdot 10^6}, \qquad (42)$$

где M_1 – массовая концентрация нитрита натрия, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3;

m – навеска продукта, г;

10^6 – коэффициент перевода в граммы.

Оформление результатов

Полученные результаты анализа сводят в таблицу рекомендуемой формы:

Наименование образцов	Используемый метод	Содержание, мг/100 г	
		нитритов	нитратов

Полученные результаты сравнивают с предельно-допустимыми значениями для данного вида продуктов, делают выводы и формулируют общие заключение по работе.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ КУЛИНАРНОЙ ГОТОВНОСТИ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Цель и задачи работы: освоить методы практического определения степени кулинарной готовности мяса и мясных продуктов. В задачи работы входит определение кулинарной готовности мясных продуктов арбитражным методом и оценка вареных мясных продуктов или колбасных изделий.

Методические указания

Принятые режимы тепловой обработки вареных колбас, вареных мясных продуктов предусматривают инактивацию тканевых ферментов. В случае разногласия в оценке кулинарной готовности вареных продуктов прибегают к использованию методов, позволяющих определить остаточную активность ферментов.

Арбитражный метод основан на фотометрическом определении в продукте интенсивности развивающейся окраски, зависящей от остаточной активности кислой фосфатазы, выраженной массовой долей фенола.

О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я: вареное мясо, мясопродукты, колбасные изделия.

Материалы, реактивы, оборудование: весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 200 г; потенциометр; фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; ультратермостат или водяная баня, обеспечивающие регулирование температуры от 30 до 99 °С; воронки; колбы мерные вместимостью 500 $см^3$ и 1000 $см^3$; пипетки, колбы, пробирки; палочки стеклянные; бумага фильтровальная лабораторная; груша резиновая; кислота лимонная; натрий лимоннокислый 5-водный; свежеприготовленный раствор динатриевой соли фенилфосфорной кислоты концентрацией 2 $г/дм^3$; растворы трихлоруксусной кислоты концентрацией 50 и 200 $г/дм^3$; раствор гидроксида натрия молярной концентрацией 0,5 $моль/дм^3$; вода дистиллированная; фенол; толуол; натрий вольфрамовокислый 2-водный; натрий молибденовокислый; литий сернокислый 1-водный; кислота ортофосфорная плотностью 1,72 $г/см^3$; кислота соляная плотностью 1,19 $г/дм^3$; бром.

Подготовка проб

Пробы продуктов из свинины освобождают от жировой ткани и шкурки, пробы вареных колбас, сосисок и сарделек – от оболочки и шпика. Пробы продуктов дважды измельчают на мясорубке, тщательно перемешивают, помещают в стеклянную или пластмассовую банку с крышкой и хранят при температуре (4 ± 2) °С до окончания анализа.

Ход работы

От каждой пробы отбирают две навески по 1 г, взвешенные с точностью до 0,001 г, переносят в две пробирки, одна из которых является опытной, а вторая – контрольной.

В пробирки вносят по 10 $см^3$ цитратного буфера с pH 6,5, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и настаивают в течение 20 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая.

В контрольную пробирку добавляют 5 $см^3$ раствора трихлоруксусной кислоты концентрацией 200 $г/дм^3$, перемешивают и добавляют 5 $см^3$ раствора динатриевой соли фенилфосфорной кислоты концентрацией 2 $г/дм^3$, выдерживают 10 мин и фильтруют.

В опытную пробирку добавляют 5 $см^3$ раствора динатриевой соли фенилфосфорной кислоты концентрацией 2 $г/дм^3$ и помещают в ультратермостат при температуре (39 ± 1) °С на 1 ч, затем добавляют 5 $см^3$ раствора трихлоруксусной кислоты концентрацией 200 $г/дм^3$, выдерживают 10 мин и фильтруют.

Для проведения цветной реакции из контрольной и опытной проб отбирают по 2,5 $см^3$ безбелкового фильтрата. В каждую пробирку добавляют 5 $см^3$ раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 0,5 $моль/дм^3$, перемешивают, выдерживают 10 мин, добавляют 1,5 $см^3$ реактива Фолина, разбавленного дистиллированной водой в соотношении 1 : 2, и перемешивают.

Через 30 мин измеряют оптическую плотность растворов по отношению к раствору трихлоруксусной кислоты на фотоэлектроколориметре с применением светофильтра с $\lambda = 600$ нм в кювете с расстоянием между рабочими гранями 10 мм или на спектрофотометре при той же длине волны в кювете аналогичного размера.

Содержание фенола определяют по градуировочному графику.

Массовую долю фенола (x, %) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 20 \cdot 100}{m \cdot 2{,}5 \cdot 10^6}, \qquad (43)$$

где m_1 и m_2 – масса фенола соответственно в опытной и контрольной пробирках, найденная по градуировочному графику, мкг;

m – масса анализируемой пробы, г;

10^6 – коэффициент пересчета в граммы;

20 – разведение, $см^3$;

2,5 – объем фильтрата, отобранный для цветной реакции, $см^3$.

Вычисления проводят до четвертого десятичного знака.

Обработка результатов

Результаты экспериментальных работ по анализу эффективности тепловой обработки вареных мясных продуктов рекомендуется оформить в виде таблицы:

Наименование образцов продукции	Массовая доля фенола, %	
	фактическая	по нормативной документации

Полученные данные сравнивают с нормативными показателями для каждого вида продукции, самостоятельно делают выводы и формулируют заключение.

Отчет о работе

1. Краткий конспект теоретического материала.
2. Цель и задачи работы.
3. Методики исследования.
4. Результаты исследований.
5. Анализ полученных данных.
6. Выводы по работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипова Л. В. Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, И. А. Рогов. – М. : Колос, 2001. – 376 с.

2. Антипова Л. В. Прикладная биотехнология. УИРС для специальности 270900: учеб. пособие / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, А. И. Жаринов. – Воронеж : Воронеж. гос. технол. акад., 2000. – 332 с.

3. Антипова Л. В. Технология и оборудование производства колбас и полуфабрикатов : учебное пособие / Л. В. Антипова, И. Н. Толпыгина, А. А. Калачев ; ред. Л. В. Антипова. – СПб. : Гиорд. – 2011. – 596 с.

4. Современные методы анализа мяса и мясопродуктов : учеб. пособие / Э. Ш. Юнусов, В. Я. Пономарев, Г. О. Ежкова [и др.] // Министерство образования и науки России, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет». – Казань : Казанский научно-исследовательский технологический университет, 2013. – 156 с.

5. Технологическая химия и физика мяса и мясных продуктов : учеб. пособие / А. А. Нестеренко, Н. С. Воронова. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – 213 с.

6. Тимошенко Н. В. Прикладная биотехнология мяса и продуктов переработки : учеб. пособие / Н. В. Тимошенко, А. А. Нестеренко, Н. С. Воронова. – Краснодар : КубГАУ, 2017. – 158 с.

7. Хвыля С. И. Выявление растительных добавок в мясных продуктах. Мясные технологии. – 2005. – № 6. – С. 18–19.

8. Хвыля С. И. Микроструктурный анализ, идентификация и фальсификация мясных продуктов / С. И. Хвыля // Пищевая промышленность, 1998. – № 5. – с. 68–70.

9. Хвыля С. И. Мониторинг состава отечественных мясных продуктов. Мясные технологии. – 2009. – №3. – С. 18–21.

10. Хвыля С. И. Разработка методологии использования систем анализа изображения для установления нутриентной фальсификации и дисперсности мясопродуктов / С. И. Хвыля / Сб. трудов ВНИИМП-М. – 1999. – С. 35–41.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Технологическая химия и физика мяса и мясных продуктов : учеб. пособие / А. А. Нестеренко, Н. С. Воронова. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – 213 с.

2. Тимошенко Н. В. Прикладная биотехнология мяса и продуктов переработки : учеб. пособие / Н. В. Тимошенко, А. А. Нестеренко, Н. С. Воронова. – Краснодар : КубГАУ, 2017. – 158 с.

3. Рогожин, В. В. Биохимия молока и мяса : учебник / В. В. Рогожин. – СПб. : ГИОРД, 2012. – 456 с. – ISBN 978-5-98879-126-3. – Текст : электронный // Электронно-библиотечная система «Лань». Режим доступа : https://e.lanbook.com/book/58740.

Дополнительная

1. Прикладная биотехнология мяса и мясопродуктов : учеб. пособие / А. А. Нестеренко, М. Б. Ребезов, Н. В. Кенийз, Э. К. Окусханова. – М. : РАКО АПК, 2019. – 172 с.

2. Бурова Т. Е. Введение в профессиональную деятельность. Пищевая биотехнология : учеб. пособие / Т. Е. Бурова. – СПб. : Лань, 2018. – 160 с. – ISBN 978-5-8114-3169-4. – Текст : электронный // Электронно-библиотечная система «Лань». Режим доступа : https://e.lanbook.com/book/108329. Для авториз. пользователей.

3. Мишанин Ю. Ф. Биотехнология рациональной переработки животного сырья : учеб. пособие / Ю. Ф. Мишанин. – СПб. : Лань, 2017. – 720 с. – ISBN 978-5-8114-2562-4. – Текст : электронный // Электронно-библиотечная система «Лань». Режим доступа : https://e.lanbook.com/book/96860. Для авториз. пользователей.

Учебное издание

Нестеренко Антон Алексеевич,
Кенийз Надежда Викторовна

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И ФИЗИКА МЯСА И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Лабораторный практикум

В авторской редакции

Подписано в печать 13.02.2020. Формат 60 × 84 $^{1}/_{16}$.
Усл. печ. л. – 9,4. Уч.-изд. л. – 7,3.

Кубанский государственный аграрный университет.
350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13