

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

В.Г. Юкало

**Лабораторний практикум з
хімії та фізики
молока і молочних продуктів**

Навчальний посібник

Тернопіль
2018

УДК 637.1+664
Ю 23

Автор:

Юкало Володимир Глібович, докт. біологічних наук, професор.

Рецензенти:

О.Й. Цісарик, докт. с/г наук, професор,
О.Б. Столяр, доктор біол. наук, професор.

Схвалено та рекомендовано до друку на засіданні
вченої ради

Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.
Протокол № 8 від 12 листопада 2018 р.

Ю 23 Юкало В.Г. Лабораторний практикум з хімії та фізики молока і молочних продуктів : навчальний посібник / Юкало В.Г. – Тернопіль : Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2018. – 176 с.

ISBN 978-966-305-096-6

УДК 637.1+664

У практикумі розглянуті методи дослідження складу молока і молочних продуктів, а також окремих важливих процесів, що відбуваються при їх виробництві. Використані загальноприйнятні класичні, стандартні, а також нові методики, розроблені або модифіковані автором. Особлива увага у практикумі надається сучасним методам дослідження та ідентифікації білків молока та їх біохімічним перетворенням. Вперше описано біохімічні властивості традиційних натуральних молокозсідальних препаратів, які з давніх часів використовуються в Україні для виробництва сирів. У вступі до кожної лабораторної роботи дається пояснення принципу методу та механізму хімічних, біохімічних та фізичних процесів, які досліджуються.

Посібник призначений для студентів спеціальності «Харчові технології» зі спеціалізацією у технології молока і молочних продуктів. Окремі методики можуть бути корисні для аспірантів і науковців, які працюють в даній галузі.

ISBN 978-966-305-096-6

© Юкало В.Г., 2018
© Тернопільський національний технічний
університет імені Івана Пулюя, 2018

ВСТУП

Даний практикум містить лабораторні роботи, які ілюструють і дозволяють закріпити знання зі складу молока та фізико-хімічних і біохімічних перетворень його компонентів під час виробництва молочних продуктів. При написанні практикуму ми старалися не повторювати роботи інших дисциплін програми підготовки інженерів, що спеціалізуються з технологій молока та молочних продуктів. Крім того, було виключено деякі малоефективні методики з початку або середини ХХ ст., які не мають реального застосування ні в заводських лабораторіях, ні у наукових дослідженнях. В зв'язку з цим в практикум включено нові лабораторні роботи, які дозволяють більш глибоко аналізувати молоко і молочні продукти, зокрема, фракційний склад молочних білків та продуктів їх перетворення. Із багатьох методів, описаних в сучасній науковій літературі, окрім необхідних класичних, були вибрані найбільш надійні, перевірені і доступні. Деякі методи можуть бути корисні для аспірантів та науковців, які працюють в цій галузі. Більшість методів були апробовані автором на кафедрі харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.

Практикум написано у відповідності до освітньо-професійної програми і навчального плану підготовки бакалаврів спеціальності 181 «Харчові технології» і спеціалізації «Технологія зберігання, консервування та переробки молока».

Лабораторна робота № 1 **ВИЗНАЧЕННЯ МАСОВОЇ ЧАСТКИ ВОДИ ТА СУХИХ РЕЧОВИН** **У МОЛОЦІ ТА МОЛОЧНИХ ПРОДУКТАХ**

Молоко – це складна харчова суміш, яка повністю задовольняє потреби організму ссавця свого виду у харчових речовинах на перших етапах його розвитку. Склад основних компонентів молока західних порід корів може коливатись у певних межах (табл. 1) залежно від породи, раціону та інших факторів.

Таблиця 1 – Склад молока західних порід корів (за даними Г. Свейсгуд, 2012)

Компоненти	Середній вміст, %	Діапазон вмісту, %
Вода	86,6	85,4–87,7
Ліпіди	4,1	3,4–5,1
Білки	3,6	3,3–3,9
Лактоза	5,0	4,9–5,0
Зола	0,7	0,68–0,74

Вміст води є одним з найважливіших показників молока і молочних продуктів. Найпоширенішими для визначення масової частки води є термогравіметричні методи. Ці методи базуються на зважуванні молока або молочних продуктів до і після висушування (доведення до постійної маси). Висушування проводять в умовах, які забезпечують рівномірність прогрівання (використання піску, марлі), а також не призводять до змін компонентів молока. Після висушування молока або молочних продуктів у певних умовах утворюється залишок, який називається сухою речовиною або сухим молочним залишком (СМЗ). Без масової частки жиру сухий молочний залишок буде сухим знежиреним молочним залишком (СЗМЗ).

Значення масової частки сухого залишку молока залежить від багатьох факторів і може коливатися від 11,0 до 14,0%, а сухого знежиреного молочного залишку від 8,0 до 9,5%.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, сир, кисломолочний сир, сушильна шафа, водяна баня, прилад Чижової, ваги лабораторні 2-го класу точності та ваги технічні 4-го класу точності з наважками, ексікатор, металеві тримачі, лактоденсиметр, термометри спиртові, металеві бюкси з кришками, марля, ножиці, папір для пакетів, пергамент, промитий хлоридною кислотою і прожарений річковий пісок, піпетки, склянки, скляні палички, кальцію хлорид безводний.

1.1. Арбітражний метод визначення сухої речовини і вологи у молоці і молочних продуктах (на основі ГОСТ 3626-73)

Суть методу визначення масової частки вологи і сухої речовини в молоці і молочних продуктах полягає у висушуванні наважки досліджуваного продукту при постійній температурі ($102\pm 2^\circ\text{C}$) та розрахунку вмісту сухої речовини і вологи. Метод використовують при виникненні суперечностей в оцінці якості. Даний метод не поширюється на визначення сухої речовини і вологи у казеїні, молочних консервах, а також сухої речовини у маслі з наповнювачами.

Хід визначення

Скляний бюкс з 20-30 г добре промитого і прожареного піску і скляною паличкою, яка не виступає за краї бюксу, розміщують у сушильній шафі і витримують при $102\pm 2^\circ\text{C}$ протягом 30-40 хв. Після цього бюкс виймають із сушильної шафи, закривають кришкою, охолоджують в ексікаторі і зважують з похибкою не більше 0,001 г. У бюкс піпеткою вносять 10 см^3 молока, або 5-10 г морозива або 3-5 г сиру, сиру кисломолочного, сиркових виробів, зважених з похибкою не більше 0,001 г, закривають кришкою і негайно зважують.

Далі вміст ретельно перемішують скляною паличкою і відкритий бюкс нагрівають на водяній бані, при частому перемішуванні вмісту до отримання сипучої маси. Після цього відкритий бюкс і кришку розміщують у сушильній шафі з температурою $(102 \pm 2)^\circ\text{C}$. Через 2 год бюкс виймають із сушильної шафи, закривають кришкою, охолоджують в ексікаторі 40 хв зважують.

Наступні зважування проводять після висушування протягом 1 год до тих пір, поки різниця між двома послідовними зважуваннями буде рівна або менша 0,001 г. Якщо при одному із зважувань після висушування буде виявлено збільшення маси, для розрахунків беруть результати попереднього зважування.

Масову частку сухої речовини C у відсотках обчислюють за формулою:

$$C = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 100}{m - m_0},$$

де m_0 – маса бюкса з піском і скляною паличкою, г;

m – маса бюкса з піском, скляною паличкою і наважкою досліджуваного продукту до висушування, г;

m_1 – маса бюкса з піском, скляною паличкою і наважкою досліджуваного продукту після висушування, г.

Розходження між паралельними визначеннями не повинно перевищувати 0,1 % для молока і 0,2 % – для морозива, сиру, кисломолочного сиру і сиркових виробів. За кінцевий результат для кожного досліджуваного продукту беруть середньоарифметичне значення двох паралельних визначень.

Масову часту вологи у продуктах W у відсотках обчислюють за формулою:

$$W = 100 - C,$$

де C – масова частка сухої речовини у відсотках, %.

Масову частку сухої знежиреної речовини у продуктах C_0 у відсотках обчислюють за формулою:

$$C_0 = C - a,$$

де C – масова частка сухої речовини у відсотках, %;

a – масова частка жиру у відсотках, %.

1.2. Прискорений метод визначення сухої речовини у пастеризованому і стерилізованому молоці та в кисломолочних напоях (на основі ГОСТ 3626-73)

Хід визначення

В металічний бюкс на дно кладуть два кружальця марлі, висушують з відкритою кришкою при 105 °С протягом 20-30 хв, закривають кришкою і охолоджують в ексикаторі 20-30 хв. Після цього зважують. У підготовлений таким чином бюкс піпеткою вносять 3 см³ досліджуваного продукту і рівномірно розподіляють його по всій поверхні марлі закривають кришкою і зважують. Потім відкритий бюкс і кришку розміщують у сушильній шафі при 105°С на 60 хв, після чого бюкс закривають, охолоджують і зважують.

Висушування і зважування продовжують через кожні 20-30 хв до одержання різниці у масі між двома послідовними зважуваннями не більше 0,001 г. Сухий залишок на поверхні марлевого кружальця повинен мати рівномірний світло-жовтий колір.

Масову частку сухої речовини C у відсотках обчислюють за формулою:

$$C = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 100}{m - m_0},$$

де m_0 – маса бюкса з марлевым кружальцем, г;

m – маса бюкса з марлевым кружальцем і наважкою досліджуваного продукту до висушування, г;

m_1 – маса бюкса з марлевым кружальцем і наважкою досліджуваного продукту після висушування, г.

Масову частку вологи у продуктах W у відсотках обчислюють за формулою:

$$W = 100 - C,$$

де C – масова частка сухої речовини у відсотках, %.

Масову частку сухої знежиреної речовини у продуктах C_0 у відсотках обчислюють за формулою:

$$C_0 = C - a,$$

де C – масова частка сухої речовини у відсотках, %;

a – масова частка жиру у відсотках, %.

Розбіжність між паралельними визначеннями повинна бути не більша 0,2 %. За кінцевий результат беруть середнє арифметичне двох паралельних визначень.

1.3. Прискорений метод визначення вологи і сухої речовини у сирах, кисломолочному сирі, і сиркових виробах (на основі ГОСТ 3626-73)

Прискорення визначення вологи і сухої речовини досягається за рахунок прогрівання досліджуваного продукту інфрачервоними променями у спеціальному приладі – вологомірі Чижової. Він складається з двох плит (круглі або прямокутні), які нагріваються електрично (рис. 1). Верхня плита відкривається, віддаль між плитами регулюється, але не повинна перевищувати

2 мм. Електронагрівач має два діапазони нагріву пластин: сильний (нагрів до 160 °С протягом 20-25 хв) і слабкий для підтримання температури під час висушування.



Рисунок 1 – Вологомір Чижової

Хід визначення

Для визначення масової частки вологи у продукті пакети (одно- або двошарові) із газетного паперу, розміром 150x150 мм складають по діагоналі, загинають кути і край приблизно на 15 мм.

При визначенні масової частки вологи у сирі, кисломолочному сирі і сиркових виробках пакет вкладають у листок пергаменту, дещо більшого розміру, ніж пакет не загинаючи краї. Готові пакети висушують у приладі протягом 3 хв при тій же температурі, при якій буде висушуватися досліджуваний продукт. Після цього їх охолоджують і зберігають у ексикаторі.

Підготовлений пакет зважують з похибкою не більше 0,01 г. У пакеті зважують 5 г досліджуваного продукту з похибкою не більше 0,01 г. Продукт

рівномірно розподіляють на внутрішній поверхні пакету. Пакет з наважкою продукту закривають, розміщують у приладі між плитами, нагрітими до необхідної температури, і витримують протягом вказаного у таблиці часу. Для досягнення температури висушування прилад спочатку включають на сильний нагрів, а потім переключають на слабкий нагрів, при якому проводять висушування.

Таблиця 2 – Умови висушування сирів

Назва продукту	Маса взірця, г	Температура нижньої плити приладу, °С	Тривалість нагрівання, хв
Сир кисломолочний і сиркові вироби, паста	5	150–152	5
Сир після пресування	5	160–162	6
Сир дозрілий	5	150–155	7
Сир плавлений	5	160–162	8

Одночасно можна висушувати два пакети. При висушуванні продуктів з відносно високою вологістю (кисломолочний сир, сиркові вироби) для запобігання розриванню пакету на початку сушіння верхню плиту приладу піднімають не більше, ніж під кутом 45° і підтримують у такому положенні до припинення інтенсивного випаровування, яке зазвичай триває 30-50 с. Після цього плиту опускають і продовжують висушувати протягом часу, встановленого для даного продукту. Пакети з висушеними взірцями охолоджують в ексікаторі 3-5 хв і зважують.

Масову частку вологи в продукті W у відсотках обчислюють за формулою:

$$W = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{5},$$

де m – маса пакета з наважкою до висушування, г;

m_1 – маса пакета з наважкою після висушування, г;

S – наважка продукту, г.

Розходження між паралельними визначеннями не повинно перевищувати 0,5 %. За кінцевий результат беруть середнє арифметичне двох паралельних визначень.

Масову частку сухої речовини у продукті C у відсотках обчислюють за формулою

$$C=100 - W,$$

де W – масова частка води у відсотках, %.

1.4. Визначення сухого залишку і сухого знежиреного залишку у молоці і молочних продуктах розрахунковим методом

Основою цього методу є кореляційна залежність між сухим залишком молока та масовою часткою жиру і густиною. Ще в кінці XIX століття у Німеччині Флейшман запропонував формулу для визначення сухого залишку у молоці. Для цього Флейшман виразив масу молока як суму масової частки жиру, сухого знежиреного залишку і води:

$$100=Ж+(СМЗ-Ж)+(100-СМЗ),$$

де $Ж$ – масова частка жиру, %;

$СМЗ$ – масова частка сухого молочного залишку, %;

$(СМЗ- Ж)$ – масова частка сухого знежиреного молочного залишку, %;

$(100 - СМЗ)$ – масова частка води, %.

Далі він розділив всі складові формули на їх питому вагу і після деяких перетворень отримав наступну формулу:

$$\text{СМЗ} = 1,2 \cdot \text{Ж} + 2,665 \frac{(100 \cdot d - 100)}{d} 100,$$

де d – питома вага молока, кг/м³.

Пізніше формула Флейшмана для використання на виробництві була спрощена Фарингтоном і Ууле. Також було враховано заміну у 1937 році поняття „Питома вага” на „Густина”. В результаті формула набула наступного вигляду:

$$\text{СМЗ} = \frac{4,9\text{Ж} + \text{Д}}{4} + 0,5 (\%),$$

де Ж – масова частка жиру, %;

Д – густина молока при 20 °С, градуси ареометра, °А;

4,9 і 4 – емпіричні коефіцієнти;

0,5 – підвищуючий коефіцієнт на густину.

Б. Ступницьким були враховані особливості складу молока в Україні і формула була відкоригована:

$$\text{СМЗ} = \frac{4,69\text{Ж} + \text{Д}}{3,78} + 0,2 (\%).$$

Масову частку сухого знежиреного молочного залишку можна визначати за формулою, запропонованою у практикумі К. Горбатової (2005):

$$\text{СЗМЗ} = \frac{\text{Д} + 2}{4} + 0,225\text{Ж} (\%).$$

При застосуванні розрахункового методу визначення сухого залишку молока необхідно забезпечити високу точність вимірювання масової частки жиру і густини молока. Помилка при визначенні густини і жирності молока суттєво впливає на значення розрахованого СЗМЗ.

Окрім визначення сухого залишку для молока існують формули для визначення сухого залишку у інших молочних продуктах. Так, за формулою Казанського можна визначити сухий молочний залишок у вершках:

$$\text{СМЗ}_{(\text{вершки})} = \frac{100 + 9,615\text{Ж}}{10,615} (\%).$$

Сухий залишок у кислотній і сичужній сироватці можна визначити за формулами Попова:

$$\text{СМЗ}_{(\text{кисл.сиров.})} = \frac{6\text{Ж} + \text{Д}}{5} + 1,33 (\%);$$

$$\text{СМЗ}_{(\text{сичуж.сиров.})} = \frac{6\text{Ж} + \text{Д}}{5} + 1,48 (\%).$$

Запитання для самоконтролю

1. Які основні компоненти входять до складу молока?
2. Які методи використовують для визначення масової частки води в молоці і молочних продуктах?
3. На чому базується термогравіметричний метод визначення масової частки води?
4. Як визначається вміст сухого залишку прискореним методом у молоці і кисломолочних напоях?
5. Опишіть хід визначення сухого залишку і води в молочних продуктах з використанням приладу Чижової.
6. На чому базується визначення сухого залишку і сухого знежиреного залишку у молоці і молочних продуктах розрахунковим методом?

Лабораторна робота № 2

БІЛКИ МОЛОКА

Масова частка білків у коров'ячому молоці становить від 3,3 до 3,9 %. Білки молока поділяються на групи і фракції, які відрізняються первинною структурою, властивостями і функціями. Основна функція білків молока – це забезпечення амінокислотного живлення. Окрім цього білки молока виконують ряд додаткових регуляторних функцій. Також вони визначають структуру, реологічні та органолептичні показники молочних продуктів. Вміст і характеристика основних фракцій молочних білків показана у табл. 3.

Таблиця 3 – Вміст і властивості окремих фракцій білків коров'ячого молока
(за Г. Фарел, 2004; П. Фокс, 2015)

Білкова фракція	Вміст у молоці (г/л)	Генетичний варіант	Молекулярна маса	Ізоелектрична точка	$D_{1\text{ см}}^{1\%}$, $\lambda=280\text{ нм}$
α_{S1} -казеїн (α_{S1} -CN)	12-15	B	23615	4,44-4,76	10,1
α_{S2} -казеїн (α_{S2} -CN)	3-4	A	25226		14,0
β -казеїн (β -CN)	9-11	A ²	23983	4,83-5,07	4,4
κ -казеїн (κ -CN)	2-4	A	19037	5,45-5,77	10,5
β -лактоглобулін (β -LG)	2-4	A B	18363 18277	5,13 5,13	9,6 10,0; 9,6
α -лактальбумін (α -LA)	0,6-1,7	B	14178	4,2-4,5	20,1- 20,9
Альбумін сироватки (SA)	0,4	A	66399	4,7-4,9	6,3-6,9
Імуноглобулін G1 (Ig G1)	0,3-0,6		161000	5,5-6,8	13,6
Секреторний компонент (SC)	0,02-0,1		63750		15,5
Лактоферин (LF)	0,02-0,1		76110	8,81	9,91

Визначення масової частки білків молока

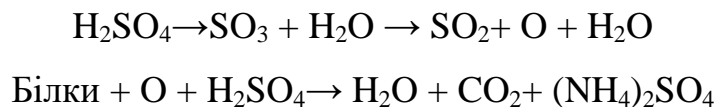
Для визначення вмісту білків у молоці і молочних продуктах існує декілька різних груп методів. Всі вони мають свої переваги, недоліки та сферу застосування. Це методи, що базуються на визначенні білків за вмістом азоту (метод К'ельдаля, метод Дюма), за вмістом карбоксильних груп (метод формольного титрування), за поглинанням ультрафіолетових променів (УФ-спектрофотометрія), за поглинанням у видимій області спектру забарвлених продуктів кількісних реакцій (біуретовий метод, метод Лоурі), за кількістю зв'язаних барвників (амідо чорний 10 В, оранжевий G, кислий оранжевий 12, метод Бредфорда з кумасі голубим G 250), за поглинанням пептидних зв'язків в інфрачервоній області спектру, за значенням показника заломлення світла. Багато з цих методів використовується у лабораторних і наукових дослідженнях. В промисловості найчастіше застосовуються стандартизовані класичні методи: К'ельдаля, формольного титрування, колориметрії та рефрактометрії.

2.1. Метод визначення масової частки загального азоту і білків за К'ельдалем (на основі ГОСТ 23327-98)

Метод розроблений Джоаном К'ельдалем в Копенгагені в 1883 р. для визначення білків у пивному ячмені. Метод з тих пір, не дивлячись на певну громіздкість і довготривалість, залишається основним для визначення білків у харчових продуктах.

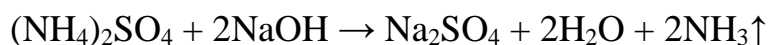
Для визначення загального азоту за К'ельдалем, молочний продукт мінералізують при високій температурі (370-400 °С) концентрованою сульфатною кислотою з окиснювачами. При цьому органічні речовини окиснюються у присутності каталізатора (CuSO_4) до CO_2 і H_2O , а весь азот

переходить в амоніак і зв'язується з сульфатною кислотою, утворюючи амонію сульфат:

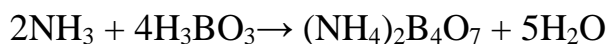


Для підвищення температури кипіння сульфатної кислоти можуть додавати K_2SO_4 .

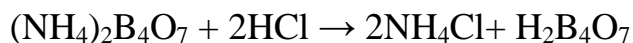
Далі концентрованим розчином NaOH нейтралізують надлишок сульфатної кислоти і розкладають амонію сульфат:



Амоніак, що утворюється відганяють парою у колбу з борною кислотою. При цьому утворюється амонію тетраборат:



Утворений амонію тетраборат, який у водному середовищі сильно гідролізований і має лужну реакцію, відтитровують стандартним розчином хлоридної кислоти:



За об'ємом $0,1$ моль/дм³ розчину хлоридної кислоти, яка була витрачена на титрування амонію тетраборату, розраховують кількість азоту. Далі, припустивши, що азот для молочних продуктів становить $15,67\%$ від маси білків, обчислюють масову частку білків. У зв'язку з тим, що незначна частина азоту ($\approx 5,5\%$) входить до складу азотистих сполук небілкової природи (сечовина, креатин, креатинін та ін.), Міжнародна молочна федерація

рекомендує використовувати коефіцієнт 0,95 при обчисленні істинного вмісту білку в молочному продукті.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, ваги лабораторні 2-го та 4-го класу точності, електроплитка, блок нагрівальний для колб К'ельдаля, колби К'ельдаля, прилад для відгонки амоніаку, колби мірні, колби конічні, бюретки, циліндри, піпетки, лійки, фільтрувальний папір, термометри, скляна трубка, концентрована сульфатна кислота, калію сульфат, купруму сульфат, 2 % розчин фенолфталеїну, розчин гідроксиду натрію з концентрацією 0,1 і 1 моль/дм³, розчин хлоридної кислоти 0,1 моль/дм³, розчин борної кислоти 0,1 моль/дм³.

Хід визначення

В колбі К'ельдаля розміщують декілька коротких відрізків скляної трубки і 10 г суміші солей (суміш 100 г калію сульфату і 0,4г купруму сульфату). У склянці з кришкою зважують 1 см³ молока. Молоко переливають у колбу К'ельдаля. Пусту склянку зважують і встановлюють масу взятого продукту.

В колбу К'ельдаля додають 10 см³ сульфатної кислоти і 10 см³ перекису водню або 0,5 г перманганату калію. Колбу К'ельдаля розміщують у гнізді алюмінієвого нагрівального блоку на електроплитці. Регулятор нагріву встановлюють у середнє положення. Після закінчення бурхливого піноутворення (приблизно через 10 хв) регулятор встановлюють у максимальнє положення. Нагрівання продовжують до тих пір, поки рідина не стане прозорою (безбарвною або ледь голубуватою). Після припинення нагріву колбу охолоджують до кімнатної температури.

Далі визначають масову частку азоту. Для цього у колбу К'ельдаля з мінералізатором додають 20 см³ дистильованої води і ретельно перемішують до повного розчинення осаду. Для перегонки амоніаку збирають апарат (рис. 2).

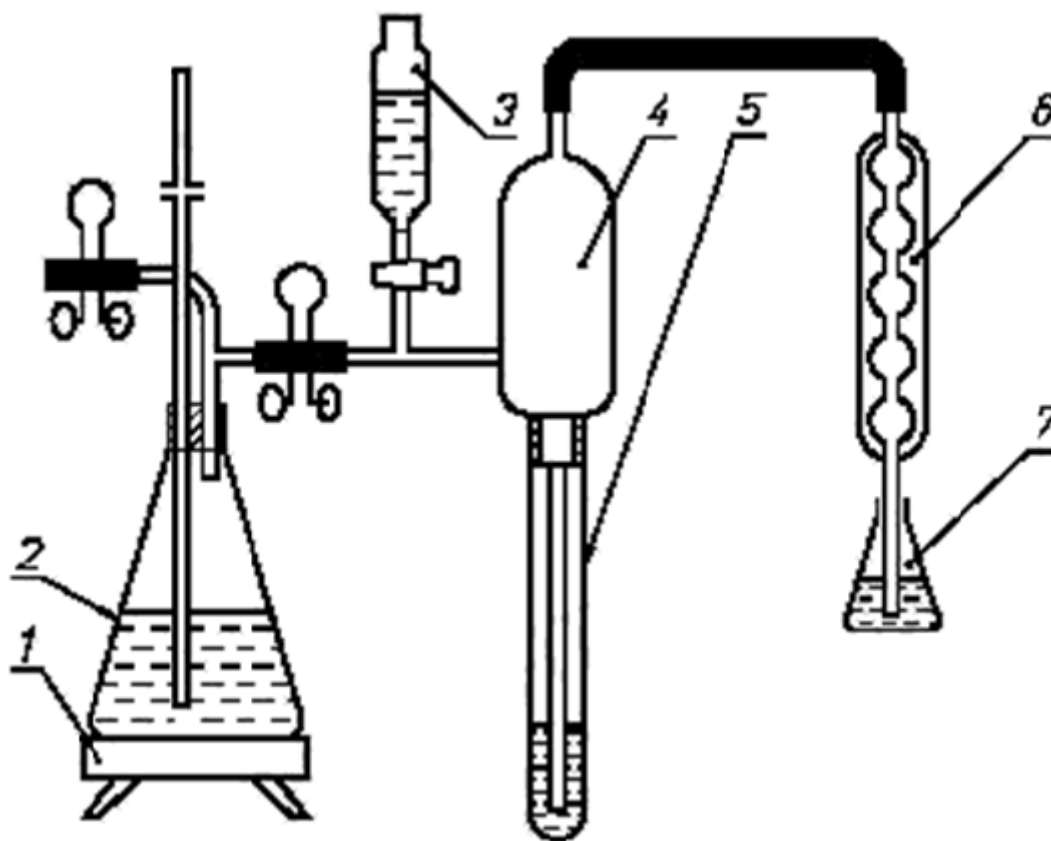


Рисунок 2– Апарат для відгонки амоніаку:

- 1– плитка електрична; 2– конічна колба-пароутворювач (2000 см³);
3– ділильна лійка; 4 – краплевловлювач; 5– колба К'ельдаля;
6– холодильник; 7– колба конічна (250 см³)

Включають електроплитку під колбою-пароутворювачем, відкривають затискач на лінії відводу пари і закривають затискач на лінії подачі пари у колбу К'ельдаля. Нагрівають воду у колбі-пароутворювачі до кипіння. Колбу К'ельдаля з мінералізатом приєднують до апарату.

У конічну колбу (7) відміряють мірним циліндром 20 см³ суміші борної кислоти з розчином індикатора. Для приготування такої суміші в 1000 см³ розчину борної кислоти (40 г борної кислоти розчиняють в 1000 см³ гарячої дистильованої води) вносять 25 см³ індикаторного розчину (0,075 г метиленового червоного і 0,200 г метиленового голубого розчиняють у 100 см³

ацетону). Конічну колбу (7) розташовують так, щоб кінець трубки холодильника знаходився нижче верхнього рівня розчину у колбі.

Далі мірним циліндром у ділильну лійку (3) вносять 50 см³ розчину гідроксиду натрію (400 г гідроксиду натрію розчиняють у 600 см³ дистильованої води) і обережно, не допускаючи викидів, переливають у колбу К'ельдаля (5). Після цього кран ділильної лійки зразу закривають. Закривають затискач на лінії відводу пари і відкривають затискач на лінії подачі пари із колби-пароутворювача у колбу К'ельдаля. Перегонка амоніаку триває до досягнення об'єму конденсату 90-120 см³. Тривалість перегонки 5-10 хв. Температура конденсованої води на виході із холодильника не повинна перевищувати 25 °С.

Після завершення перегонки вміст конічної колби (7) з розчином індикатора, борної кислоти і конденсатом титрують розчином хлоридної кислоти концентрацією 0,2 моль/дм³ (вміст двох ампул стандарт-титру хлоридної кислоти вносять в мірну колбу місткістю 1000 см³, доводять до позначки дистильованою водою і перемішують) до зміни кольору із зеленого на фіолетовий (у точці еквівалентності – колір сірий) і визначають об'єм кислоти, який було витрачено на титрування. Періодично або при заміні реактивів необхідно проводити контрольне вимірювання, використовуючи замість продукту 1 см³ дистильованої води.

Масову частку загального азоту X (%) обчислюють за формулою :

$$X = \frac{1,4 \cdot (V_1 - V_2) \cdot c}{m},$$

де V_1 – об'єм кислоти, затрачений на титрування, см³;

V_2 – об'єм кислоти, затрачений на титрування при контрольному вимірюванні, см³;

c – концентрація хлоридної кислоти, моль/дм³;

m – маса наважки продукту, г;

1,4 – коефіцієнт перерахунку об'єму кислоти у масову частку загального азоту (г·дм³)/(моль·см³).

Масову частку білку Y (%) обчислюють за формулою:

$$Y = 6,38 \cdot X,$$

де 6,38 – маса молочного білку, еквівалентна одиниці маси загального азоту.

За остаточний результат вимірювання приймають середньоарифметичне значення результатів двох паралельних вимірювань, округлюючи результат до другого десяткового знаку.

2.2. Визначення білків молока колориметричним методом (на основі ГОСТ 25179-90)

Колориметричний метод визначення масової частки білків у молоці базується на здатності білків молока при значеннях рН, менших від їх ізоелектричної точки, зв'язувати кислий барвник – амідочорний 10 Б. При цьому утворюється нерозчинний осад. Зменшення оптичної густини розчину барвника за рахунок зв'язування його частини білком молока пропорційне масовій частці білків.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко непастеризоване, ваги лабораторні 4-го класу точності, колориметр фотоелектричний або спектрофотометр для вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 590 нм, термометри, штативи, пробірки, лійки, піпетки, мірні колби (50, 200, 500, 1000, 2000 см³), кислота лимонна, натрій ортофосфат двохзаміщений, гідроксид натрію, сульфатна кислота, барвник амідочорний 10 Б.

Перед визначенням білків готують розчин барвника з використанням буферного розчину. Для приготування буферного розчину 31,7 г лимонної кислоти і 8,40 натрію ортофосфату ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) розчиняють в 400 см³

води при 70 °С і охолоджують до кімнатної температури. Для приготування розчину барвника зважують 4,60 амідочорного 10 Б і висипають його в колбу (500 см³), додають 400 см³ води і розчиняють при 70 °С. Отриманий розчин фільтрують в мірну колбу (2000 см³), змиваючи з фільтру водою залишки слідів барвника. В колбу додають приготовлений буферний розчин, охолоджують і доливають водою до позначки. Значення рН отриманого розчину повинно бути $2,3 \pm 0,1$. При потребі рН необхідно відкоригувати концентрованою сульфатною кислотою або гідроксидом натрію. Оптична густина розведеного в 50 разів розчину барвника повинна мати значення $0,82 \pm 0,02$ при довжині хвилі 590 нм. У разі необхідності значення оптичної густини можна зменшити додаванням буферного розчину або збільшити додаванням розчину барвника. Розчин барвника можна використовувати через 12 годин після приготування. Зберігати його необхідно в холодильнику в темному скляному посуді.

Хід визначення

У пробірку піпеткою вносять 1 см³ молока, додають 20 см³ розчину барвника і закривають гумовим корком, перемішують перевертанням пробірки (без утворення піни). Далі пробірку розташовують у центрифугі і центрифугують при 1000 об./хв протягом 20 хв. З надосадової рідини піпеткою відбирають 1 см³ і вносять в мірну колбу місткістю 50 см³. В колбу доливають дистильовану воду до позначки і перемішують. Аналогічно у 50 разів розбавляють водою робочий розчин барвника.

Далі на фотоелектроколориметрі вимірюють оптичну густина розбавленого розчину барвника по відношенню до розбавленого вмісту колби з надосадовою рідиною.

Масову частку білка X (%) обчислюють за формулою:

$$X = 7,78 D - 1,34,$$

де D – визначена оптична густина, од. оптичної густини;

7,78 – емпіричний коефіцієнт, % од. оптичної густини;

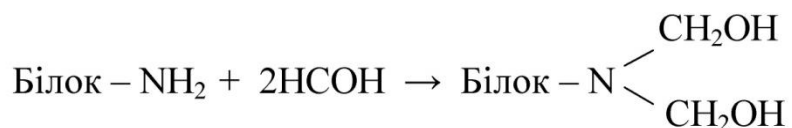
1,34 – емпіричний коефіцієнт, %.

Межа допустимої похибки результатів вимірювань в діапазоні масової частки білка 2,5-4,0 % складає $\pm 0,1$ % з ймовірністю $P=0,80$ і розходженням між двома паралельними вимірюваннями не більше як 0,1 % масової частки білка.

За остаточний результат вимірювання беруть середньоарифметичне значення двох паралельних спостережень, округлюючи результат до другого десяткового знаку. Якщо розходження між результатами, отриманими в різних лабораторіях, перевищує 0,1 % масової частки білка, то вимірювання проводять за методом К'ельдаля.

2.3. Визначення масової частки білка в молоці методом формольного титрування (на основі ГОСТ 25179-90)

Метод базується на пропорційній залежності між кількістю вільних карбоксильних груп білка молока і його масовою часткою у молоці. Для визначення білка використовують приріст титрованої кислотності після блокування вільних аміногруп білків молока формальдегідом:



Для визначення можна використовувати молоко з кислотністю, що не перевищує 20 °Т. Метод використовується при згоді постачальника молока.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, бюретка, мірні колби, конічні колби, піпетки, формалін, натрію гідроксид, 2,5 % розчин кобальту сульфату, 2 % спиртовий розчин фенолфталеїну.

Хід визначення

В колбу (100 см³) вносять 20 см³ молока і 0,25 см³ 2 % спиртового розчину фенолфталеїну. Вміст колби титрують розчином гідроксиду натрію (0,1 моль/дм³) до появи рожевого забарвлення, яке відповідає забарвленню еталону (суміш 20 см³ молока і 0,5 см³ 2,5 % розчину кобальтосульфату). Далі в колбу вносять 4 см³ нейтралізованого 40 % формаліну (нейтралізований формалін отримують додаванням до 50 см³ формаліну 3-4 крапель 2 % спиртового розчину фенолфталеїну, а пізніше по краплях додають спочатку 40 %, а в кінці 0,1 моль/дм³ розчин гідроксиду натрію до появи слаборожевого забарвлення) і знову титрують розчином гідроксиду натрію (0,1 моль/дм³) до появи забарвлення, яке відповідає еталону. Кількість лугу, яка була витрачена на друге титрування (см³), множать на коефіцієнт 0,959 і таким чином отримують масову частку білка в молоці у відсотках.

Також, для визначення масової частки білка в молоці за кількістю розчину гідроксиду натрію, який був витрачений на друге титрування молока, використовують дані таблиці (табл. 4).

Таблиця 4 – Залежність масової частки білка від об'єму розчину лугу, який був витрачений на титрування після додавання формаліну до взірців молока

Кількість розчину NaOH, см ³	Масова частка загального білка у молоці, %	Кількість розчину NaOH, см ³	Масова частка загального білка у молоці, %
2,45	2,35	3,25	3,12
2,50	2,40	3,30	3,16
2,55	2,44	3,35	3,21
2,60	2,49	3,40	3,25
2,65	2,54	3,45	3,31
2,70	2,59	3,50	3,35
2,75	2,64	3,55	3,40
2,80	2,69	3,60	3,45
2,85	2,73	3,65	3,50
2,90	2,78	3,70	3,53
2,95	2,83	3,75	3,60
3,00	2,88	3,80	3,65
3,05	2,93	3,85	3,69
3,10	2,98	3,90	3,74
3,15	3,03	3,95	3,79
3,20	3,07	4,00	3,84

2.4. Визначення концентрацій білків молока спектрофотометричним методом

Метод базується на здатності білків поглинати світлові кванти в ультрафіолетовій області спектру. Ультрафіолетові хвилі довжиною 190-200 нм поглинає пептидний зв'язок, а хвилі довжиною близько 280 нм поглинає система делокалізованих електронів бензольного кільця амінокислотних залишків тирозину й індольної групи триптофану. Також у ближній ультрафіолетовій області (257 нм) поглинає залишок амінокислоти фенілаланіну за рахунок системи делокалізованих електронів бензольного кільця. Оптична густина розчинів білків, які містять вказані амінокислоти, при довжині хвилі 280 нм прямо пропорційна їх концентрації у розчині. Метод дає добрі результати для визначення концентрації індивідуальних білків молока, для яких встановлені коефіцієнти оптичної густини $D_{1\text{см}}^{1\%}$ (табл. 1). Також з дещо меншою точністю можна визначити концентрацію білків казеїнового комплексу ($D_{1\text{см}}^{1\%} = 8,2$) та білків сироватки молока ($D_{1\text{см}}^{1\%} = 12,3$). Спектрофотометричний метод використовується переважно у наукових дослідженнях, пов'язаних з білками молока. Він дозволяє швидко визначити концентрацію білків у великій кількості взірців.

Матеріали, реактиви і обладнання

Розчин казеїну, розчин індивідуальних фракцій казеїну, штативи з пробірками, мірні колби, циліндри, піпетки, спектрофотометр СФ-46, кварцеві односантиметрові кювети.

Хід визначення

Водні розчини індивідуальних казеїнів ($\alpha_{\text{S1-CN}}$, $\beta\text{-CN}$, $\kappa\text{-CN}$) вносять окремими піпетками у кварцеві кювети і вимірюють оптичну густина, встановивши довжину хвилі 280 нм. Якщо значення оптичної густини

перевищує 0,3, то необхідно провести розведення розчинів білків для того, щоб потрапити в інтервал значень оптичної густини $0,1 \leq D_{280} \leq 0,3$. У цьому інтервалі спостерігається пряма залежність між концентрацією білка і оптичною густиною.

Концентрацію казеїну, білків сироватки молока або їх індивідуальних фракцій обчислюють за формулою:

$$C = \frac{1 \% \cdot D_{1\text{см}}^x \%}{D_{1\text{см}}^{1 \%}}$$

де C – концентрація білка, яку визначають, %;

$D_{1\text{см}}^x \%$ – оптична густина (280 нм) розчину білка невідомої концентрації, од. оптичної густини;

$D_{1\text{см}}^{1 \%}$ – оптична густина 1 % розчину білку, од. оптичної густини;

1% – концентрація білка, яку використовували для встановлення його коефіцієнта поглинання, %.

2.5. Виділення основних груп білків з молока

Білки молока включають дві великі групи – це білки казеїнового комплексу і білки сироватки молока (табл. 5).

Окрім вказаних білків до складу молока входить невелика за кількістю (< 1 %), але дуже гетерогенна група білків жирових кульок. Ці білки відділяються при знежиренні молока і входять до складу жирової фази. Також у молоці є протеозо-пептона фракція – РР, яка складається переважно з великих і середніх за розміром пептидів, і фракція небілкового нітрогену NPN (близько 3 % від загального нітрогену молока). Небілковий нітроген містить вільні амінокислоти, сечовину, креатин, креатинін, нуклеотиди, аміносахариди та ін.

Таблиця 5 – Основні білки молока (за Г. Свейсгуд, 2012)

Білок	Вміст у молоці, г/л	Масова частка від всіх білків, %	Властивості
Білки казеїнового комплексу:	24-28	80	Осаджуються в ізоелектричній точці (рН 4,6)
α_{S1} – казеїни	12-15	34	
α_{S2} – казеїни	3-4	8	
β – казеїни	9-11	25	
κ – казеїни	3-4	9	
γ – казеїни	1-2	4	
Білки сироватки молока:	5-7	16	Денатурують і осаджуються після нагрівання до 100°C
β -лактоглобулін	2-4	9	
α -лактальбумін	1-1,5	4	
альбумін сироватки крові	0,1-0,4	1	
імуноглобуліни	0,6-1	2	
Протеозо-пептонна фракція	0,6-1,8	4	Осаджується у присутності 12% трихлороцтової кислоти

Білки молока фракціонують з давніх часів. Так, казеїни з молока вперше кислотою осадив Д. Малдер у 1838 році, а у 1883 році О. Гаммарстен удосконалив цей метод, який зараз є загальноприйнятим. Казеїн, отриманий цим методом, називається «казеїн за Гаммарстеном». Пізніше було встановлено, що із сироватки молока, яка залишається після кислотного осадження казеїну, можна виділити групу нестійких до високих температур білків, яка отримала назву «білки сироватки молока». Після осадження і відділення білків сироватки молока у розчині залишається протеозо-пептонна фракція і небілковий нітроген. Якщо до цього розчину додати трихлороцтову кислоту до концентрації 12 %, то компоненти протеозо-пептонної фракції

випадають в осад, а в розчині залишаються фракції небілкових азотистих сполук – небілковий нітроген. У 1938 р. С. Ровланд запропонував схему для фракціонування білків молока і кількісного визначення основних груп білків і небілкового нітрогену методом К'ельдаля. Схема визначення показана на рис. 3.

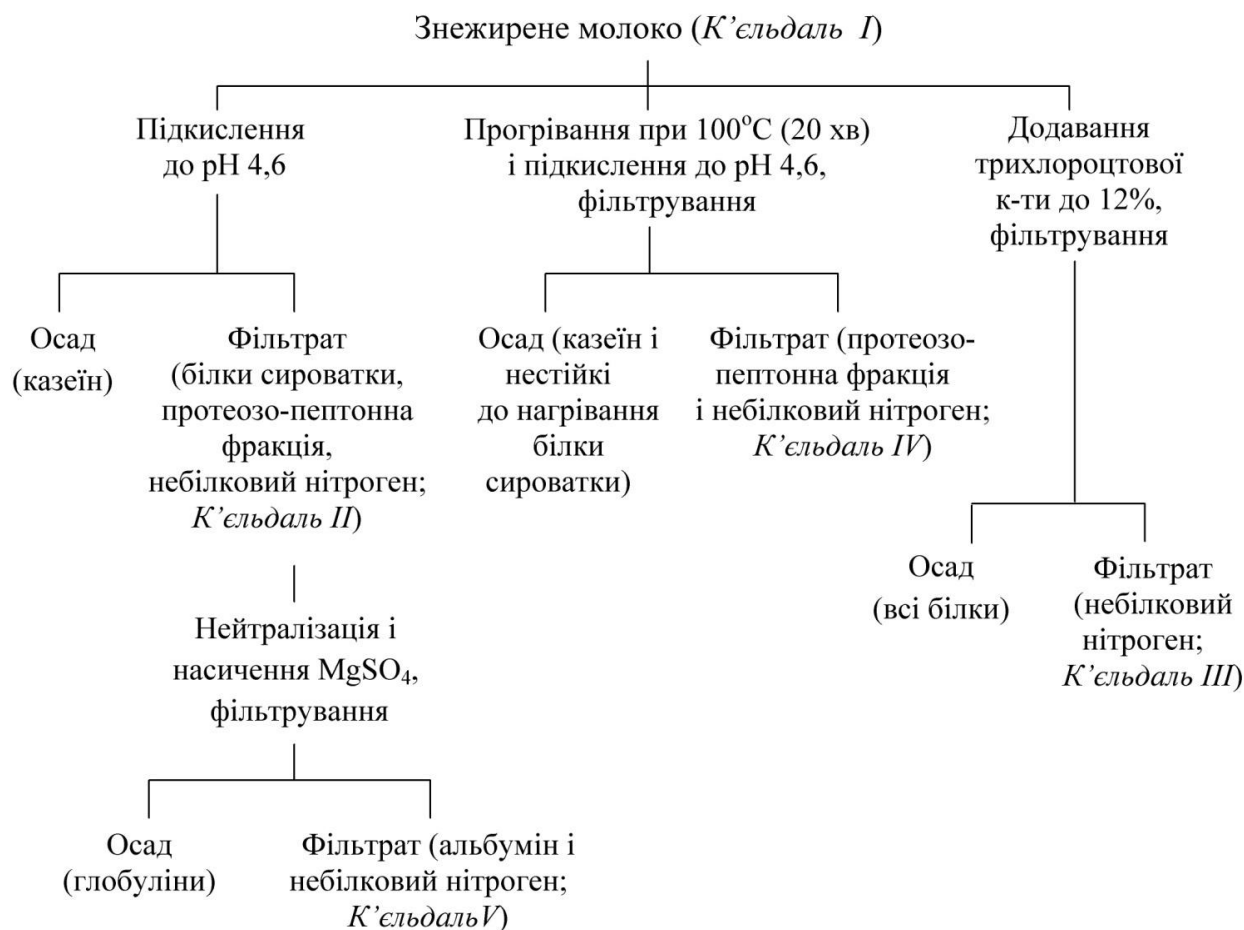


Рисунок 3 – Схема кількісного фракціонування основних груп білків молока:
 загальний нітроген = *К'ельдаль I*;
 казеїн = *К'ельдаль I – К'ельдаль II*;
 білки сироватки молока = *К'ельдаль II– К'ельдаль IV*;
 протеозо-пептонна фракція = *К'ельдаль IV– К'ельдаль III*;
 небілковий нітроген = *К'ельдаль III*

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, центрифуга ОПН-8, водяна баня, рН-метр, центрифужні пробірки, склянки, колби, пробірки, лійки, піпетки, фільтрувальний папір, хлоридна кислота, трихлороцтова кислота.

Хід фракціонування

Виділення білків жирових кульок молока

Свіже, тепле (35-40°C) незбиране молоко центрифугують на центрифугу ОПН-8 15 хв при 5000 об./хв. Знежирене молоко (нижня водна фаза у центрифужній пробірці) використовують далі для отримання казеїнів, білків сироватки і протеозо-пептонної фракції. Жирову фазу промивають три рази дистильованою водою для відділення залишків білків знежиреного молока. Мембрани жирових кульок молока, які містять білки жирових кульок, відділяють збивання жирової фази у ротаційному шейкері. Далі мембрани із сколотин (маслянки) відділяють центрифугуванням або екстракцією.

Аналіз отриманих білків можна проводити електрофорезом у неперервному (за К. Вебером і М. Озборном) або перервному (за У. Лемлі) поліакриламідних гелях. На сьогоднішній день ще не всі білки жирових кульок ідентифіковані і остаточно не встановлені їхні біологічні функції.

Виділення білків казеїнового комплексу молока

До знежиреного молока додають при перемішуванні хлоридну кислоту (1 моль/дм³) до досягнення ізоелектричної точки казеїну (рН 4,6). Визначення рН контролюють рН-метром. Осад загального казеїну відцентрифугують (3000 об./хв, 10 хв). Надосадову рідину – кислу молочну сироватку далі використовують для отримання білків сироватки і протеозо-пептонної фракції.

Осад казеїнів промивають дистильованою водою. Для кращого відділення білків сироватки, отриманий казеїн розчиняють у дистильованій воді при додаванні гідроксиду натрію (1 моль/дм³). При цьому слідкують, щоб значення рН не перевищувало 7,5-8,0. Після розчинення казеїну його знову осаджують хлоридною кислотою, як було описано раніше. Процедуру повторюють 2 рази для отримання очищеного загального казеїну. Фракційний склад казеїну аналізують електрофорезом у лужній системі однорідного поліакриламідного гелю в присутності сечовини.

Виділення білків сироватки молока

Молочну сироватку, яка залишилась після осадження казеїнів, нагрівають на водяній бані до 95°C і витримують при цій температурі 20 хв. Далі, охолоджують до кімнатної температури і фільтрують або центрифугують при 5000 об./хв протягом 10 хв. В осаді отримують денатуровані білки сироватки молока, а у надосадовій рідині (або фільтраті) – протеозо-пептонну фракцію та небілковий нітроген. Для виділення нативних білків сироватки молока можна використати гель-фільтрацію на G-25 або іншій хроматографічній матриці з аналогічними властивостями.

Фракційний склад отриманого препарату білків сироватки молока можна аналізувати диск-електрофорезом у нативних умовах або у денатуруючих умовах у присутності додецилсульфату натрію.

Виділення протеозо-пептонної фракції молока

Надосадова рідина після виділення білків сироватки молока містить протеозо-пептонну фракцію і небілковий нітроген. Для розділення цих фракцій використовують трихлороцтову кислоту. При цьому до 10 см³ надосадової рідини додають 10 см³ 24% трихлороцтової кислоти, охолоджують до 4 °C і залишають відстоятися (10 год). Осад компонентів протеозо-пептонної фракції відцентрифугують у скляній центрифужній пробірці при 1000 об./хв

протягом 10 хв або відфільтровують. Надосадова рідина (або фільтрат) містить компоненти небілкового нітрогену.

Запитання для самоконтролю

1. Які білки входять до складу молока?
2. Якими методами визначають масову частку білків у молоці?
3. В чому полягає суть методу визначення масової частки загального азоту і білків молока за К'ельдалем? Які реакції відбуваються при цьому?
4. Як проводиться визначення білків молока колориметричним методом?
5. Наведіть послідовність визначення масової частки білків у молоці методом формольного титрування.
6. На чому базується спектрофотометричний метод визначення концентрації білків молока?
7. Якими методами можна виділити основні групи білків молока?

Лабораторна робота № 3

ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІЛКІВ МОЛОКА

Електрофоретичні методи досліджень відіграють важливу роль у вивченні білків молока. Ще в 1936 році О. Міленде за допомогою фронтального електрофорезу довів гетерогенність казеїну і ідентифікував три фракції, які були названі α -, β - і γ -казеїнами. Р. Вейк і Р. Белдвін у 1961 році зональним електрофорезом у крохмальному гелі розділили казеїн на майже 20 фракцій. Така ефективність була досягнута за рахунок використання 7 моль/дм³ сечовини, яка унеможливлювала агрегацію білків казеїнового комплексу. Починаючи з 1963 року Р. Петерсоном для електрофорезу білків був запроваджений не менш ефективний, але більш зручний в роботі поліакриламідний гель (ПАГ). З тих пір різні варіанти електрофорезу в ПАГ стали основними методами для аналізу і ідентифікації білків молока. Враховуючи велику гетерогенність білків молока і суттєві відмінності їх властивостей, для аналізу казеїнів, білків сироватки молока і білків жирових кульок використовують різні електрофоретичні методи.

Комітет з номенклатури і методології білків молока Американської асоціації молочних наук рекомендує використовувати для класифікації і ідентифікації білків молока їх електрофоретичну рухливість під час одновимірного електрофорезу в ПАГ. Для одночасного аналізу всіх білків молока в останні роки також застосовують двохвимірний електрофорез в ПАГ.

Матеріали, реактиви і обладнання

Казеїн, діалізована сироватка, молоко, апарат для електрофорезу на пластинках ПАГ, апарат для електрофорезу в трубочках з ПАГ, джерело постійного струму, центрифуга, ваги аналітичні, електроплитка, мікрошприц, шприц на 10 см³, штатив з пробірками, кристалізатор, мірні колби, циліндри, піпетки, акриламід (АА), N,N'-метиленбісакриламід (МБА), персульфат амонію

(ПСА), N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), карбамід, веронал, тріс (гідроксиметил) амінометан (ТРИС), етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), гліцин, сахароза, оцтова кислота, хлоридна кислота, 0,5 %-й розчин амідочорного 10Б у 7% оцтовій кислоті, 0,1 % розчин кумасі R-250 у 7 % оцтовій кислоті, розчин бромфенолового синього (1 мг/100 см³ H₂O).

3.1. Електрофорез білків казеїнового комплексу молока (за Юкалом В.Г., 2007)

Найбільш поширений і ефективний електрофорез білків у присутності додецилсульфату натрію (ДСН) за У. Лемлі є малоприматним для аналізу казеїнів. Це пояснюється особливостями зв'язування ДСН різними фракціями казеїну. Так, кількість ДСН, зв'язаного казеїновими фракціями (окрім β -казеїну), зростає із підвищенням температури від 20 до 80 °С. У β -казеїну після 40 °С зв'язування ДСН зменшується. В результаті, за даними електрофорезу з ДСН молекулярна маса α_{S1} -СН і κ -СН більша від реальної величини на 8000 і 10000 Да відповідно і лише у фракції β -СН наближається до значення знайденого на основі амінокислотного складу. Другою причиною малої ефективності електрофоретичної системи У. Лемлі є близькі значення молекулярних мас казеїнових фракцій. У зв'язку з цим комітет з номенклатури і методології білків молока рекомендує використовувати для аналізу казеїнів анодну систему однорідного ПАГ у присутності сечовини.

У лабораторії біохімії білків молока ТНТУ імені Івана Пулюя запропонований варіант такої електрофоретичної системи (В. Юкало, 2007) і виготовлений апарат типу Стадієра для аналізу казеїнів у вертикальних пластинках однорідного ПАГ у присутності сечовини (рис.4). Конструкція електрофоретичної камери дозволяє одночасно аналізувати від одного до семи взірців білків залежно від вибраного формера в абсолютно однакових умовах.

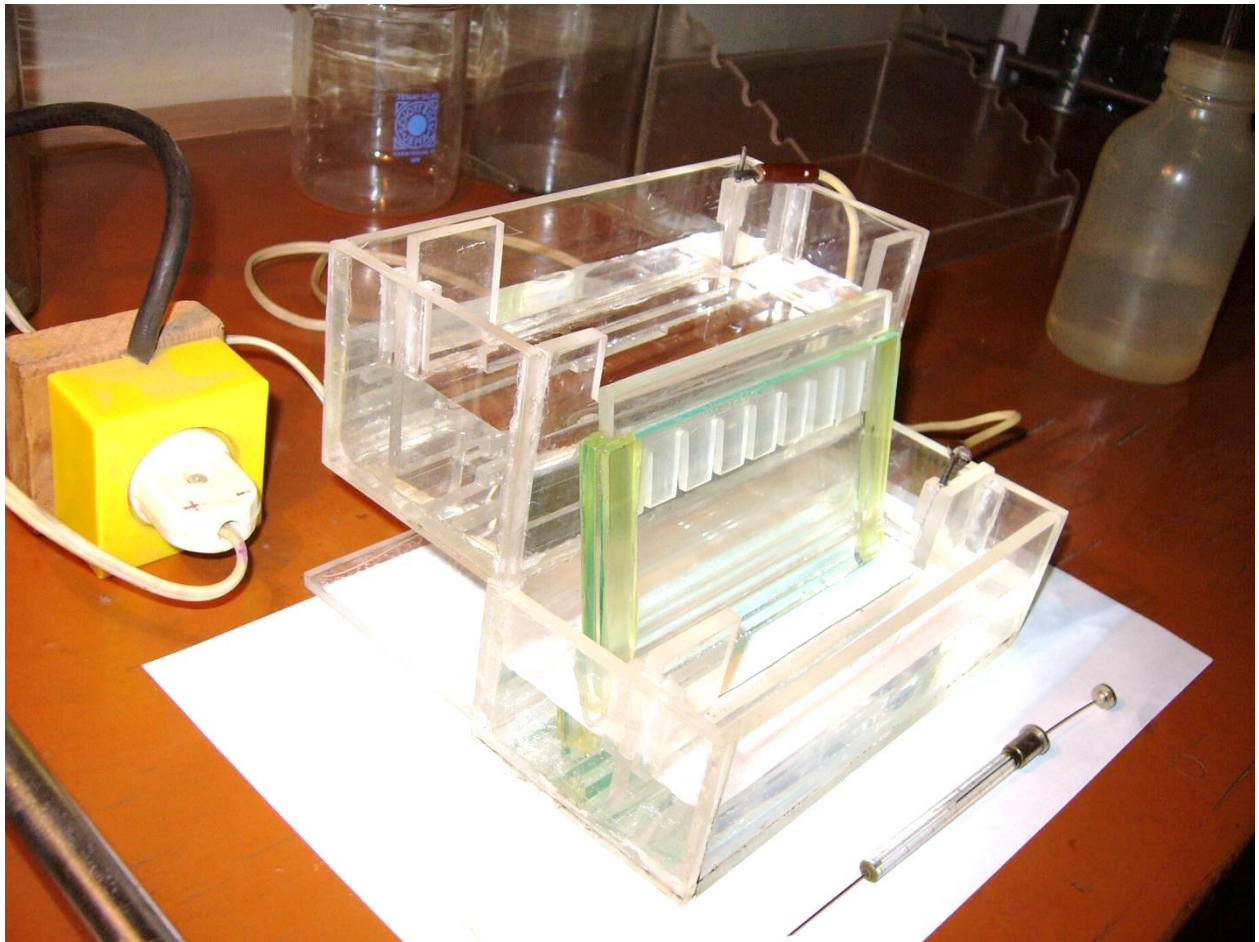


Рисунок 4 – Апарат для електрофорезу білків казеїнового комплексу
молока у пластинках ПАГ

Перед проведенням електрофорезу необхідно приготувати наступні розчини:

Електродний буфер (pH 7,9)

Тріс – 6,09 г

ЕДТА – 2,0 г

Веронал – 11,0 г

До 2000 см³ H₂O

Буфер для взірців (pH 7,9)

Тріс – 30,5 мг

ЕДТА – 10,0 мг

Веронал – 55 мг

2-меркаптоетанол – 0,25 см³

Сечовина – 13,5 г

До 50 см³ H₂O

<i>Компоненти гелю</i>	<i>Буфер для гелю (pH 7,9)</i>	<i>Розчин каталізатора і ініціатора</i>
АА – 13,5 г	Тріс – 0,609 г	ПСА– підбирали
МБА – 0,75 г	ЕДТА – 0,2 г	експериментально
	Веронал – 1,1 г	ТЕМЕД – 0,05 см ³
	2-меркаптоетанол – 1 см ³	
	Сечовина – 54 г	
<hr/>	<hr/>	<hr/>
<i>До 100 см³ H₂O</i>	<i>До 100 см³ H₂O</i>	<i>До 10 см³ H₂O</i>
1 частина	2 частини	1 частина

Кількість персульфату підбирають таким чином, щоб забезпечити полімеризацію акриламідів і утворення гелю протягом 30-40 хв.

Взірець для аналізу розчиняють у буфері для взірців і центрифугують (7000 об./хв) для відділення нерозчиненого матеріалу. Для збільшення густини розчину взірця до нього додають сахарозу і як сигнальний барвник – бромфеноловий синій.

Хід проведення електрофоретичного аналізу

З чотирьох скляних деталей склеюють робочу електрофоретичну камеру. Нижній отвір камери закривають плівкою. Камеру фіксують у вертикальному положенні. Компоненти гелю у вказаних пропорціях ретельно перемішують і заливають у камеру. Для формування стартових комірок у камеру вставляють відповідний формер. Після полімеризації формер обережно, щоб не зруйнувати гель, дістають з камери. Робочу камеру з гелем встановлюють в нижню буферну ємкість апарату. У буферні ємкості і верхню частину електрофоретичної камери заливають електродний буфер.

Розчини взірців вносять у стартові комірки під буфер у кількості від 0,01 см³ до 0,05 см³ з допомогою мікрошприца або мірного капіляра. Взірець

повинен рівномірно осісти на дно комірки. Від цього у значній мірі залежить якість електрофореграми. Після внесення взірців буферні розчини у електрофоретичній камері і верхній буферній ємкості з'єднують подвійною смужкою фільтрувального паперу і підключають електроди до джерела живлення. Спочатку (до входження білків у гель, 10 хв) задають силу струму 20 мА, а далі електрофорез проводять при постійній силі струму – 50 мА. Коли сигнальний барвник досягне нижньої межі гелю, відключають струм і дістають пластинку гелю для фіксації і забарвлення. При цьому електрофоретичну камеру розклеюють при нагріванні країв, обережно переносять пластинку гелю у кристалізатор і заливають розчином барвника. У барвнику пластинку витримують 30 хв, в результаті чого білки фіксуються у гелі і забарвлюються. Далі барвник, який не зв'язався з білками, відмивають 7 % розчином оцтової кислоти, періодично змінюючи розчин, поки фон не стане повністю прозорим. Залежно від використаного барвника на пластинці ПАГ можна виявити від 5 до 50 мкг білку. Комітет з номенклатури і методології білків молока рекомендує використовувати більш чутливий барвник – кумасі R-250.

Результати електрофоретичного аналізу оформляють у вигляді фотографії забарвленої пластинки ПАГ (електрофореграми) або схеми розміщення на ній білкових смужок. На одержаній електрофореграмі ідентифікують казеїнові фракції за відстанню, яку вони проходять в гелі, або з допомогою маркерних білків. Як маркерні білки можна використовувати очищені казеїнові фракції. Для кількісного аналізу проводять денситометрію пластинок ПАГ і будують денситограми.

Електрофореграма типового розділення білків казеїнового комплексу в даній електрофоретичній системі показана на рис. 5.

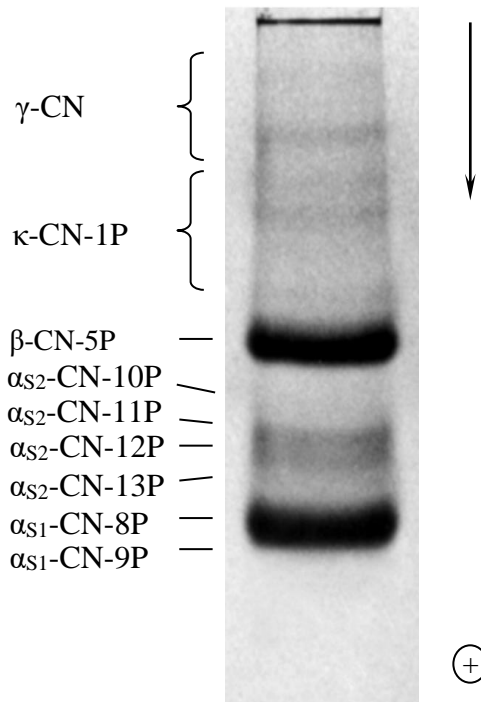


Рисунок 5 – Електрофореграма загального казеїну, отримана з використанням лужної системи гелю в присутності сечовини (В. Юкало, 2007)

3.2. Електрофорез білків сироватки молока (за Б. Девісом у модифікації В. Юкала, 2007)

Білки сироватки молока є високо гетерогенними, водорозчинними глобулярними білками. Фракції білків сироватки суттєво відрізняються між собою за молекулярними масами і зарядами молекул при нейтральних і слабколужних значеннях рН середовища. У зв'язку з цим для їх аналізу рекомендують використовувати диск-електрофорез у присутності або без ДСН. Електрофоретична система за присутності ДСН дає хороші результати розділення білків сироватки молока. Причому отримані молекулярні маси близькі до значень, розрахованих на основі первинної структури (рис. 6). також для аналізу білків сироватки молока можна використовувати систему нативного диск-електрофорезу для нейтральних і кислих білків.

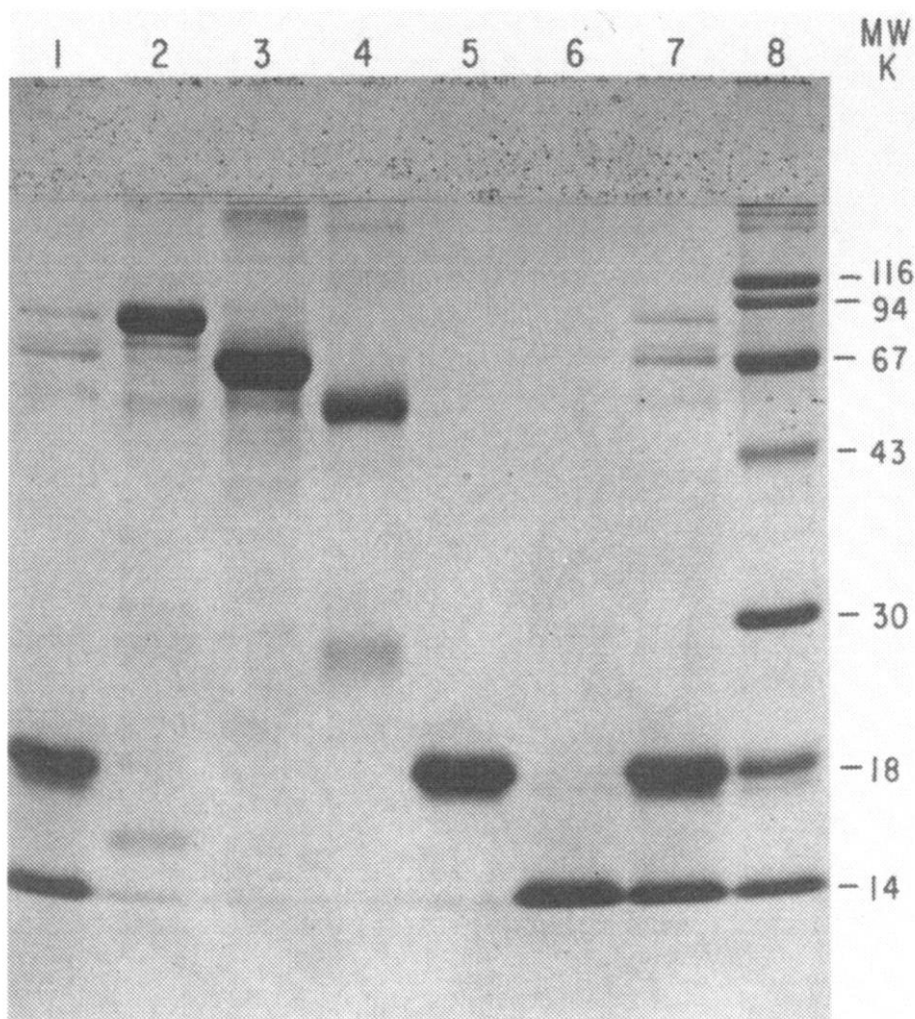


Рисунок 6 – Диск-електрофорез білків сироватки молока у присутності ДСН (Д. Басч, 1985): 1 – діалізована сироватка; 2 – лактоферин; 3 – альбумін сироватки крові; 4 – імуноглобулін G; 5 – β -лактоглобулін; 6 – α -лактальбумін; 7 – діалізована сироватка; 8 – маркерні білки.

При цьому білки розділяються за електрофоретичною рухливістю у слабколужному середовищі. Електрофорез можна проводити у вертикальних пластинках ПАГ і в стовпчиках гелю. В даній роботі ми будемо аналізувати білки сироватки молока в системі нативного диск-електрофорезу в апараті фірми «Reanal» (Угорщина) з трубочками для ПАГ (рис. 7). Система диск-електрофорезу за рахунок концентруючого гелю забезпечує високу ефективність розділення, що

є важливим при наявності в сироватці молока великої кількості фракцій (особливо мінорних).

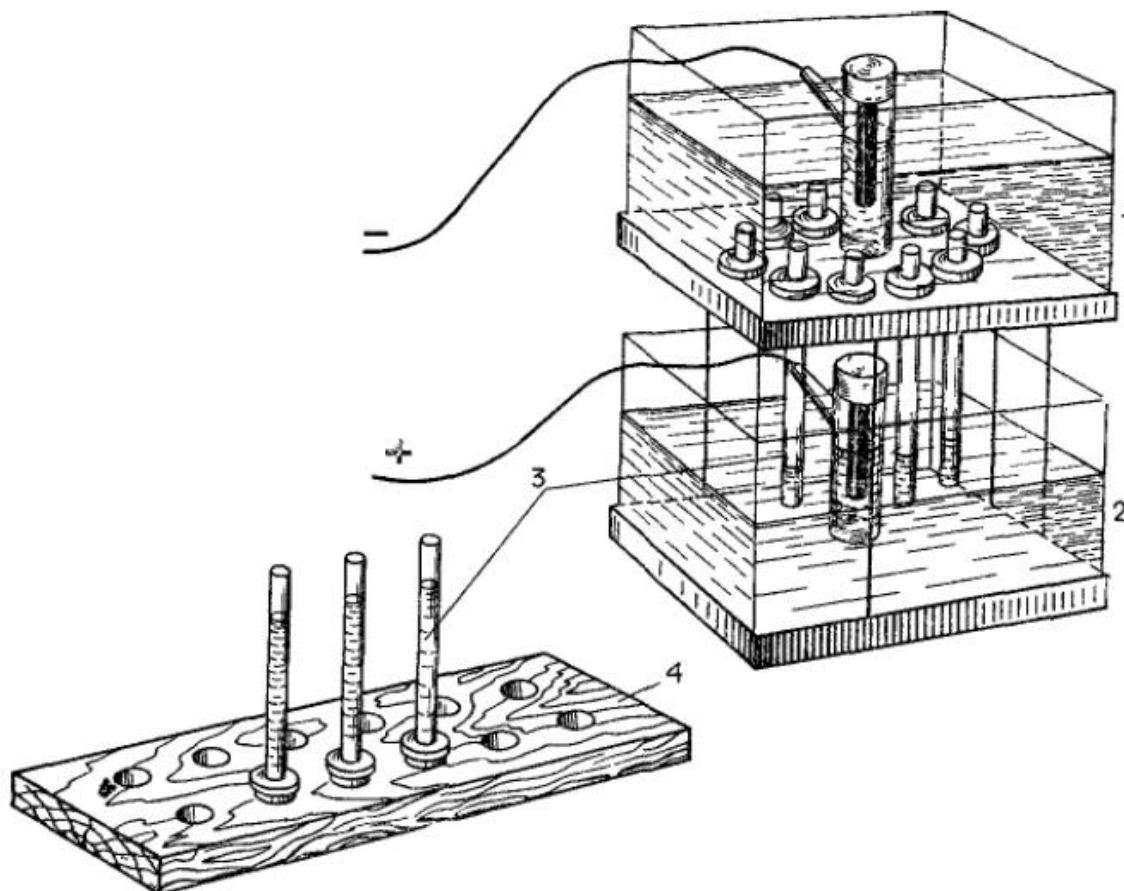


Рисунок 7 – Апарат для електрофорезу з трубочками для ПАГ фірми «Reanal»:

1, 2 – резервуари для електродного буферу; 3 – трубочки для ПАГ;

4 – підставка для трубочок.

За основу взято електрофоретичну систему нативного диск-електрофорезу для кислих і нейтральних білків Б. Девіса. Незначні зміни нами внесені у склад концентруючого гелю. Перед проведенням аналізу необхідно приготувати наступні реактиви:

1. Складові частини розділяючого гелю (рН 8,9):

1 н НСІ – 24 см ³	Акриламід (АА) – 15 г	Персульфат амонію (ПСА) – підбирали експериментально
ТРІС – 18,3 г	Метиленбісакриламід (МБА) – 0,4 г	
ТЕМЕД – 0,115 см ³		
до 50 см ³ H ₂ O	до 50 см ³ H ₂ O	до 50 см ³ H ₂ O
1 частина	2 частини	5 частин

2. Складові частини концентруючого гелю (рН 6,9):

1 н НСІ – 24 см ³	АА – 5 г	Сахароза – 20 г	ПСА – підбирали експериментально
ТРІС – 2,99 г	МБА – 1,25 г		
ТЕМЕД – 0,23 см ³			
до 50 см ³ H ₂ O	до 50 см ³ H ₂ O	до 50 см ³ H ₂ O	до 20 см ³ H ₂ O
1 частина	2 частини	4 частини	1 частина

3. Електродний буфер (рН 8,3) включає (перед використанням розводити в 10 разів):

ТРІС – 6 г

Гліцин – 28,9 г

до 1000 см³ H₂O

Як взірець для аналізу використовують діалізовану проти електродного буферу молочну сироватку після ізоелектричного осадження казеїну. Для збільшення густини взірця додають сахарозу і як сигнальний барвник – бромфеноловий синій.

Хід проведення електрофоретичного аналізу

Полімеризацію ПАГ проводять у скляних трубочках, закріплених на спеціальній підставці (рис. 7.4). Спочатку піпеткою вносять розділяючий гель, попередньо приготовлений у мірному циліндрі і ретельно перемішаний. Для утворення рівної верхньої границі зверху акуратно нашаровують дистильовану воду (0,3 см³). Після полімеризації воду видаляють і вносять в трубочку розчин компонентів концентруючого гелю і теж нашаровують дистильовану воду.

Після закінчення полімеризації концентруючого гелю видаляють воду, а трубочки вкручують в отвори дна верхнього резервуару для електродного буферу. З'єднують обидва резервуари і заповнюють електродним буфером.

Взірець (0,1 см³) вносять під буфер у трубочку мікросприцом. Апарат підключають до джерела постійного струму. До входження взірця в концентруючий гель встановлюють силу струму 1,5-2 мА на трубочку, а після входження силу струму збільшують до 4-5 мА на трубочку. Завершують електрофорез після досягнення сигнальним барвником нижньої границі розділяючого гелю. Далі трубочки викручують з апарату і з допомогою шприца з дистильованою водою з них дістають стовпчики гелю. Гелі розміщають в окремі пробірки і заливають барвником (амідочорний 10Б (10 хв) або кумасі R-250 (60 хв)). Після забарвлення барвник відмивають 7 % оцтовою кислотою. Гелі зберігають в 7 % оцтовій кислоті.

Результати електрофорезу оформлюють у вигляді фотографії гелю (електрофореграми) або схеми розміщення білкових фракцій. Фракції білків сироватки молока на електрофореграмі ідентифікують за відстанню, яку вони проходили у гелі, або з допомогою маркерних білків (очищених індивідуальних білків сироватки молока). Типове розділення білків сироватки молока в даній системі показано на рис. 8.

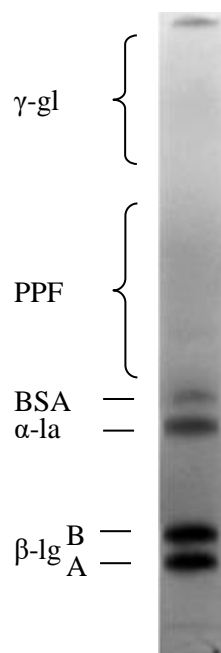


Рисунок 8 – Диск-електрофорез білків сироватки молока (В. Юкало, 2007)

Запитання для самоконтролю

1. Яку роль відіграють методи електрофорезу у дослідженні фракційного складу білків молока?
2. Чому для аналізу основних груп білків молока використовують різні системи електрофорезу?
3. Опишіть основні стадії електрофорезу білків казеїнового комплексу. Які фракції казеїну можна ідентифікувати електрофорезом?
4. Які види електрофорезу використовують для аналізу білків сироватки молока?
5. Опишіть основні стадії диск-електрофорезу білків сироватки молока.

Лабораторна робота № 4
ГЕЛЬ-ФІЛЬТРАЦІЯ БІЛКІВ МОЛОКА,
МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ І КАЗЕЇНОВОГО КОМПЛЕКСУ

Гель-фільтрація – це один з видів рідинної хроматографії, де розподіл молекул відбувається між нерухомою фазою, якою є рідина у гранулах гелю (матриці) та рухомою фазою – рідиною, що рухається між гранулами гелю. Розподіл молекул між цими фазами залежить від здатності молекул проникати через пори у гранули гелю залежно від величини пор та молекулярної маси і форми молекул. Певну роль тут також відіграє заряд молекул, який спричиняє електростатичне відштовхування і унеможливорює входження частини молекул в гранули гелю. Деталі процесу гель-фільтрації розглядались у курсі біохімії. Незважаючи на меншу ефективність у порівнянні з іншими видами рідинної хроматографії, гель-фільтрація є поширеним методом у дослідженні біомолекул. Перевагами гель-фільтрації є відносна простота і доступність методу, можливість багаторазового використання без регенерації хроматографічної колонки. Також матриці, які застосовують для гель-фільтрацій, стійкі у широкому діапазоні рН, іонної сили, температури та за присутності денатуруючих агентів. Під час гель-фільтрації біомолекули, як правило, зберігають свою нативну будову і властивості. Застосування гель-фільтрації для вивчення білків молока пов'язане з іменем нашого земляка М.П. Тарасюка, який після громадянської війни був змушений виїхати в США і там проводив свої дослідження.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко знежирене свіже, казеїн, молочна сироватка, система для рідинної хроматографії, колектор фракцій, рН-метр, спектрофотометр СФ-46, центрифуга ОПН-8, пробірки, склянка, лійки, фільтрувальний папір, піпетки, набір сефадексів (G-100, G-150, G-200), Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , сечовина, ТРІС.

4.1. Гель-фільтрація білків молока

Широке застосування гель-фільтрації для фракціонування білків молока тривалий час стримувалось відсутністю ефективних методів ідентифікації та повної класифікації білків молока, а також ускладнювалося близькістю їх молекулярних мас. У міру вивчення білків молока були створені передумови для успішного застосування гель-фільтрації для аналізу і фракціонування загального білка молока. Враховуючи значення молекулярних мас головних молочних білків (табл. 3), найчастіше використовувалися сефадекси G-100, G-150 і G-200. Найбільш ефективним серед них виявився сефадекс G-200.

Хід фракціонування

Знежирене молоко центрифугують для очищення від забруднюючих домішок і нерозчинних частинок на центрифугу ОПН-8 при 7000 об./хв протягом 15 хв. Обережно відбирають 2 см³ молока з центрифужної пробірки і вносять у ємкість для взірців хроматографічної системи (рис. 9). Хроматографічну колонку (2×70 см), заповнену сефадексом G-200 і зрівноважену хроматографічним буфером, підключають до ємкості із взірцем молока та ємкості з хроматографічним буфером (0,015 моль/дм³ фосфатний буфер, рН 6,7) через перехідний кран. Далі вводять взірець у колонку і кран переводять на ємкість із хроматографічним буфером. Після цього відкривають вихід з колонки і встановлюють швидкість елюції в межах 20-25 см³/год. Елюент дискретно відбирають колектором фракцій (по 4 см³ у пробірку). Концентрацію білків у кожній пробірці визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм. Гель-фільтрацію завершують після виходу об'єму елюату, який у півтора рази перевищує об'єм колонки.

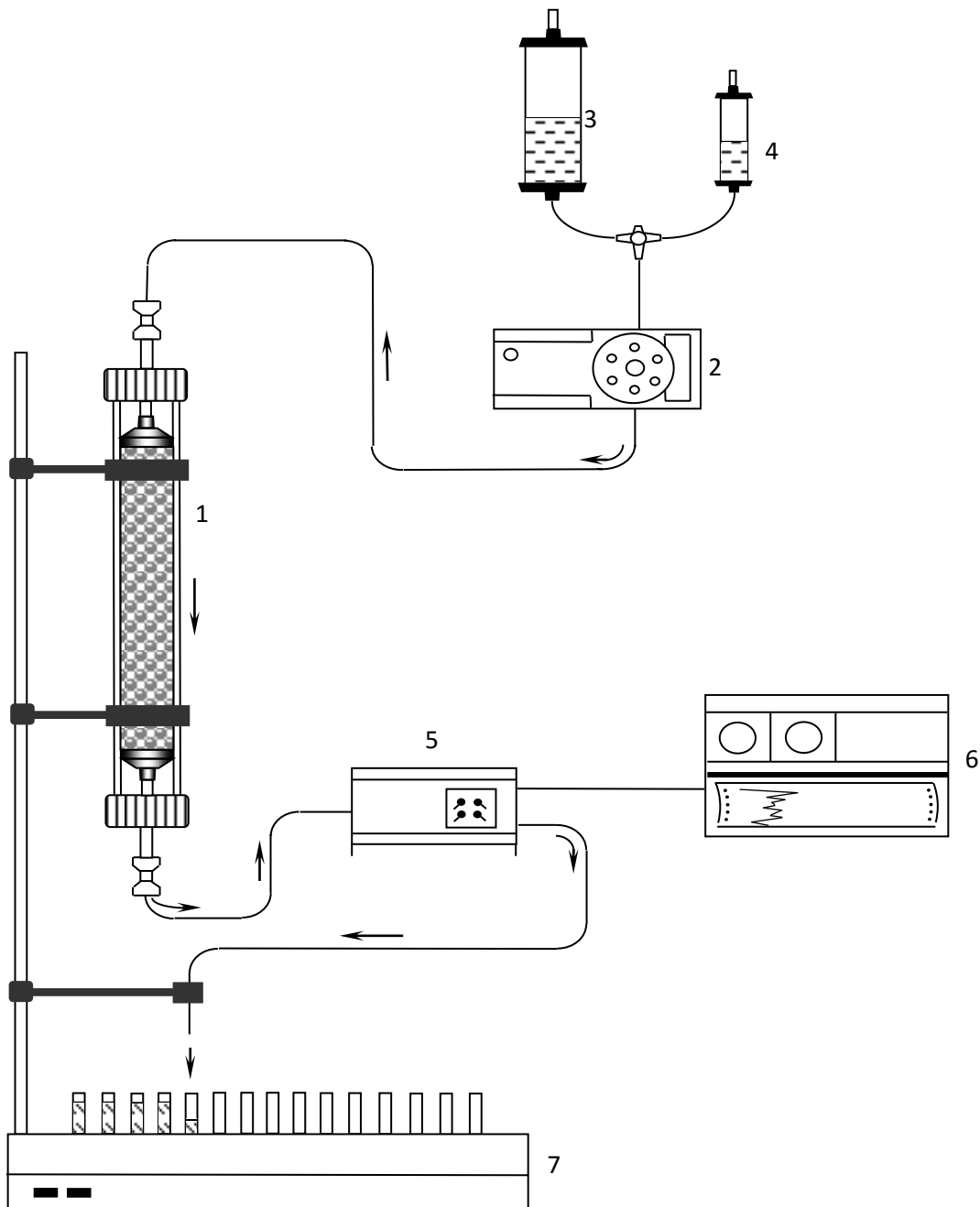


Рисунок 9 – Хроматографічна система для гель-фільтрації:

- 1 – колонка з сефадексом; 2 – мікронасос; 3 – ємкість для рухомої фази;
4 – ємкість для взірця; 5 – проточний УФ-детектор;
6 – потенціометричний реєстратор; 7 – колектор фракцій

Результат гель-фільтрації (хроматограму) представляють у вигляді графіка залежності концентрації білку (од. оптичної густини) від номеру пробірки або об'єму елюату. Типовий вигляд хроматограми білків знежирного

молока показано на рис. 10. Отримано 5 хроматографічних фракцій. Вміст пробірок із заштрихованих секторів хроматографічних фракцій об'єднували і аналізували методами електрофорезу.

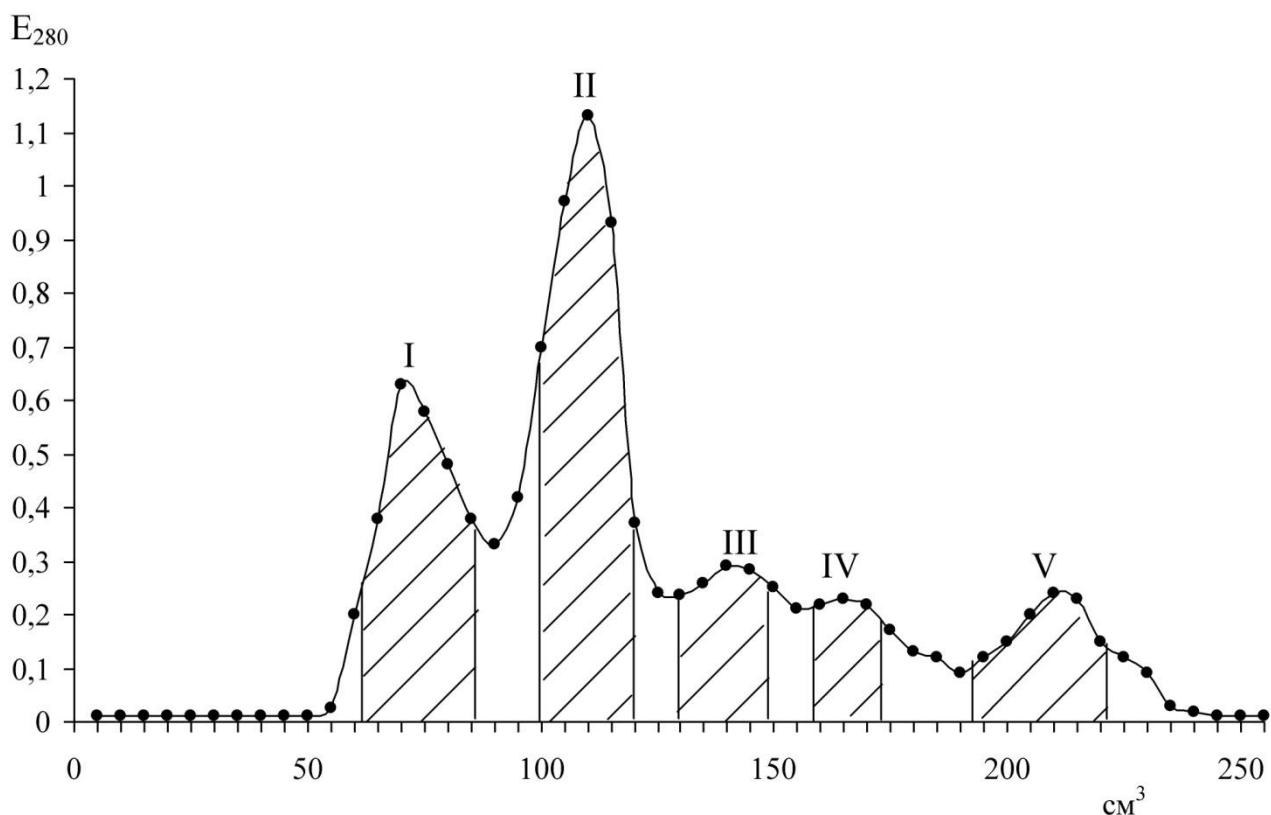


Рисунок 10 – Хроматограма білків знежиреного молока, одержана на сефадексі G-200

Результати електрофорезу окремих фракцій знежиреного молока після гель-фільтрації на сефадексі G-200 показані на рис. 11. Перші дві хроматографічні фракції включають суміш білків казеїнового комплексу. При цьому майже весь κ -CN знаходиться в першій фракції, яка виходить з об'ємом, близьким до вільного об'єму колонки. Це може бути міцелярний казеїн, молекулярна маса якого досягає десятків мільйонів Дальтон. Відомо, що верхня межа діапазону молекулярних мас білків, які входять в гранули сефадексу G-200, досягає 600 000 Да. Друга фракція складається переважно з суміші α_S - і β -казеїнів. Молекулярна маса, яка відповідає об'єму виходу другої фракції, значно перевищує молекулярну масу α_{S1} -CN, α_{S2} -CN і β -CN. Очевидно, ці

казеїни знаходяться у вигляді агрегатів. За результатами диск-електрофорезу (рис. 11) у третій хроматографічній фракції міститься β -лактоглобулін з домішками α -лактальбуміну, в четвертій – α -лактальбумін з домішками β -лактоглобуліну. П'ята фракція, очевидно, включає компоненти протеозопептонної фракції молока, а також низькомолекулярні пептиди і амінокислоти, які переважно не фіксуються в ПАГ.

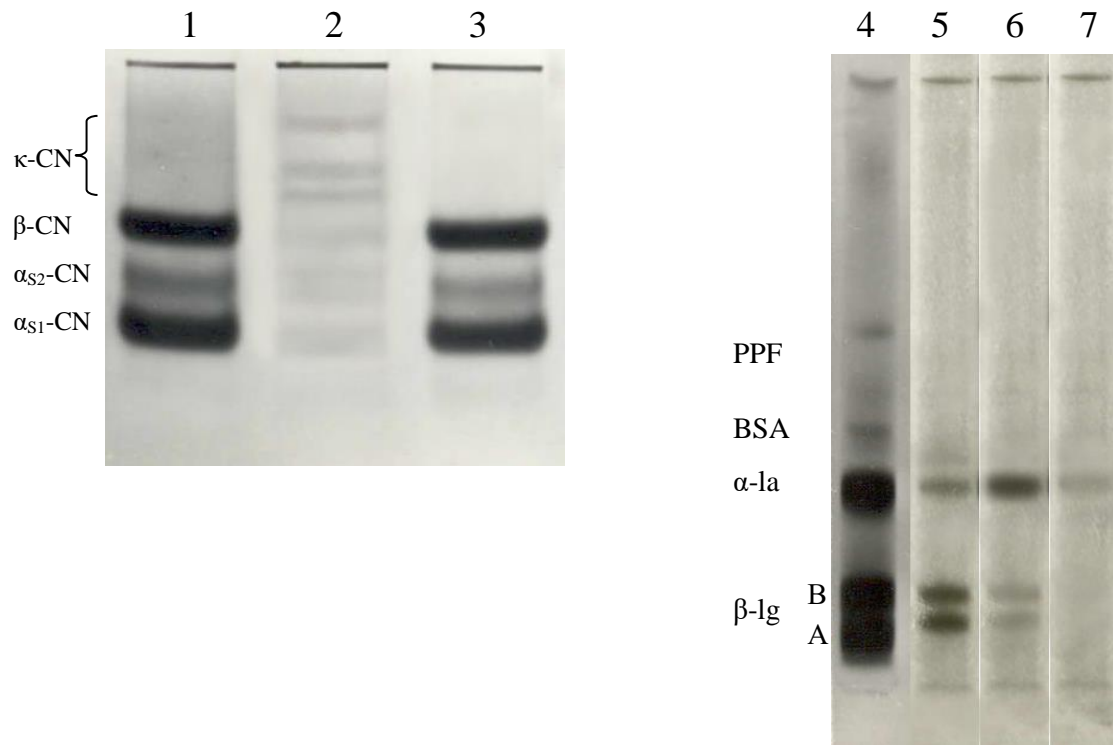


Рисунок 11 – Електрофореграма загального казеїну (1), хроматографічних фракцій I (2) і II (3) в лужній системі гелю з сечовиною. Електрофореграми білків сироватки молока (4) і хроматографічних фракцій III (5), IV (6) IV (7), одержаних методом диск-електрофорезу (В. Юкало, 2007)

4.2. Гель-фільтрація білків сироватки молока

Білки сироватки молока відрізняються суттєво за своїми молекулярними масами. Вони не утворюють надмолекулярних структур і є глобулярними білками. Ці властивості сприяють їх розділенню при гель-фільтрації. Проте білки сироватки є дуже гетерогенним і окрім декількох основних фракцій

включають багато мінорних білків. У зв'язку з цим класична гель-фільтрація не може забезпечити виділення гомогенних фракцій з білків сироватки. Скоріше вдається отримати групи фракцій, з яких можна виділити гомогенні білки повторною гель-фільтрацією або іншими методами.

Однією з найбільш ефективних матриць для гель-фільтрації білків сироватки молока є сефадекс G-150. При цьому можна отримати чотири хроматографічні фракції з різними групами білків. Дезагрегуючі агенти (сечовина, детергенти, 2-мертаптоетанол) не використовують. Значення рН для хроматографічного буферу повинно бути не менше 7,5, щоб унеможливити утворення димерів β -лактоглобулінами.

Хід фракціонування

Для фракціонування відбирають 7 см³ свіжої сироватки після осадження казеїнів, фільтрують або центрифугують (5000 об./хв, 10 хв). Очищену сироватку вносять у хроматографічну колонку (1,5×70 см), заповнену сефадексом G-150, зрівноважену тріс-гліциновим буфером для диск-електрофорезу (рН 8,3). Встановлюють швидкість елюції 20-25 см³/год. У пробірку відбирають по 4 см³ елюату. Концентрацію білків у кожній пробірці визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм. Результати гель-фільтрації представляють у вигляді хроматограми (графік залежності концентрації білків від номеру пробірки). Типовий результат гель-фільтрації білків сироватки на сефадексі G-150 показано на рис. 12.

Вміст пробірок із заштрихованих секторів об'єднували і аналізували диск-електрофорезом у нативних умовах. Результати електрофорезу показані на рис. 13. Видно, що перша хроматографічна фракція включає імуноглобуліни, лактоферин і альбумін сироватки крові. Друга фракція переважно містить β -лактоглобулін, а третя – суміш α -лактальбуміну і β -лактоглобуліну. У четвертій фракції містяться низькомолекулярні компоненти протеозо-пептонної фракції, а також небілкового нітрогену, які не затримуються в акриламідному гелі і відповідно не проявляються. Повторна гель-фільтрація отриманих фракцій дозволяє виділити гомогенні імуноглобуліни і β -лактоглобулін.

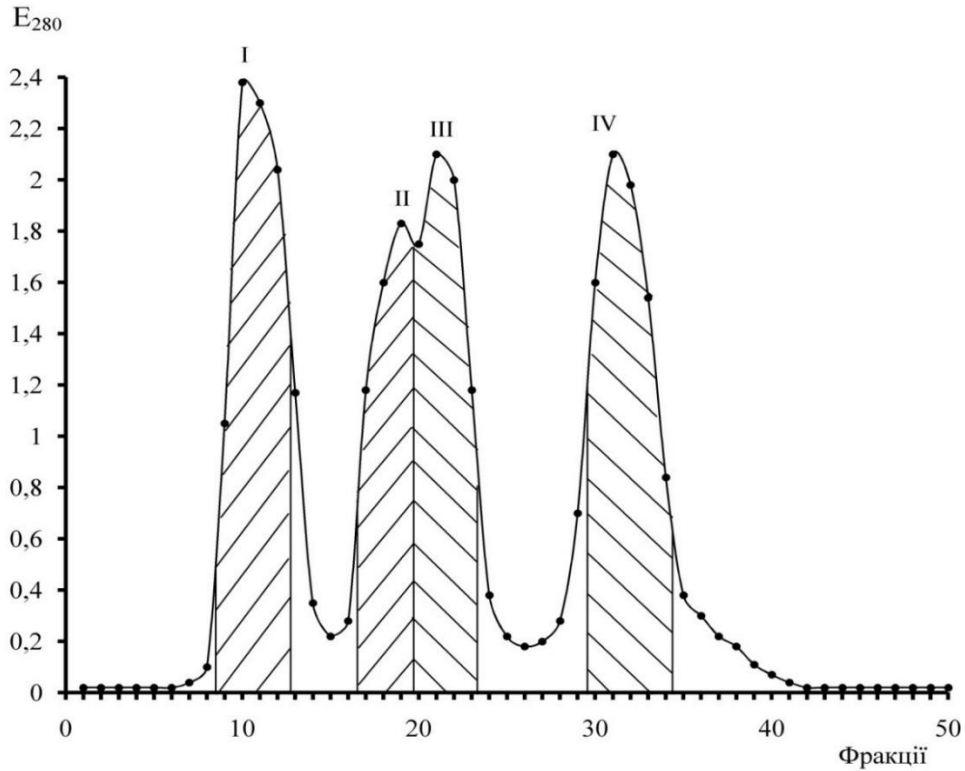


Рисунок 12 – Хроматограма білків сироватки молока, отримана на сефадексі G-150. Об'єднані елюати із заштрихованих секторів використовували для електрофоретичного аналізу

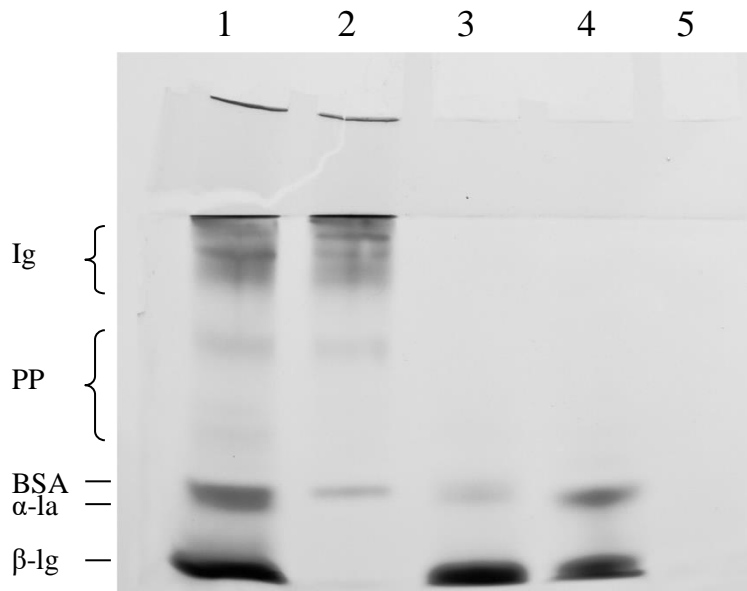


Рисунок 13 – Електрофореграма білків сироватки молока (1), об'єднаних фракцій піку I (2), II (3), III (4) і IV(5) після гель-фільтрації на сефадексі G-150 (В. Юкало, 2018)

4.3. Гель-фільтрація білків казеїнового комплексу

Фракціонування казеїнів гель-фільтрацією ускладнюється близькістю значень їхніх молекулярних мас (табл. 3) та вираженою тенденцією до самоасоціації. Крім цього, κ -казеїни здатні утворювати надмолекулярні структури за рахунок дисульфідних зв'язків. Відомо, що нативний κ -казеїн у молоці може існувати у вигляді агрегатів, які включають від 2 до 8 мономерів. Фракція α_{S2} -казеїну, яка теж містить два залишки цистеїну, у розчині існує переважно як мономер. Враховуючи це у буфер для гель-фільтрації включають сечовину, а значення рН буферу задають вищі від значень рН молока, але не більше 8,0. Відновлюючі реагенти для SH-груп залишків цистеїну (2-меркатостанол; 1,4-дитіотреїтол) у буфер для гель-фільтрації переважно не додають. Це призводить до утворення надмолекулярних структур κ -казеїну з високими молекулярними масами.

Дослідження показали, що найбільш ефективною матрицею для гель-фільтрації білків казеїнового комплексу є сефадекс G-150. З його використанням можна одностадійно отримати гомогенний κ -казеїн, а після повторної гель-фільтрації – також очищений β -казеїн і частково очищений α_{S1} -казеїн.

Хід фракціонування

Для фракціонування 100 мг загального казеїну розчиняють у 7 см³ хроматографічного буферу (0,005 моль/дм³ тріс, рН 7,9; 6 моль/дм³ сечовина) і центрифугують (7 000 об./хв, 10 хв) або фільтрують. Далі розчин казеїну вносять у хроматографічну колонку (1,5×70 см), заповнену сефадексом G-150 (fine) і зрівноважену цим же буфером. Гель-фільтрацію проводять при швидкості елюції 20-25 см³/год. Колектором у кожену пробірку відбирають по 2 см³ елюату. Концентрацію білків у кожній пробірці визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм.

Результати гелі-фільтрації представляють у вигляді графіка, який відображає залежність концентрації білка від номеру пробірки. Хроматографічний профіль казеїнів після гелі-фільтрації на сефадексі G-150 показано на рис. 14. Вміст пробірок із заштрихованих секторів об'єднували і аналізували електрофорезом в лужній системі однорідного поліакриламідного гелю. Результати аналізу фракційного складу казеїнів представлені на електрофореграмі (рис. 15). Перша хроматографічна фракція (I) складається виключно з κ -казеїну. Друга фракція (II) переважно представлена β -казеїном, а фракція III – α_S -казеїнами з домішками β -казеїну. Отримані хроматографічні фракції II і III можна використовувати для повторної гелі-фільтрації і виділення гомогенних β - і α_S -казеїнів. Відсутність α_{S2} -казеїнів у складі першої хроматографічної фракції підтверджує припущення, що у них утворюються переважно внутрішньомолекулярні сульфгідрильні зв'язки між залишками цистеїну.

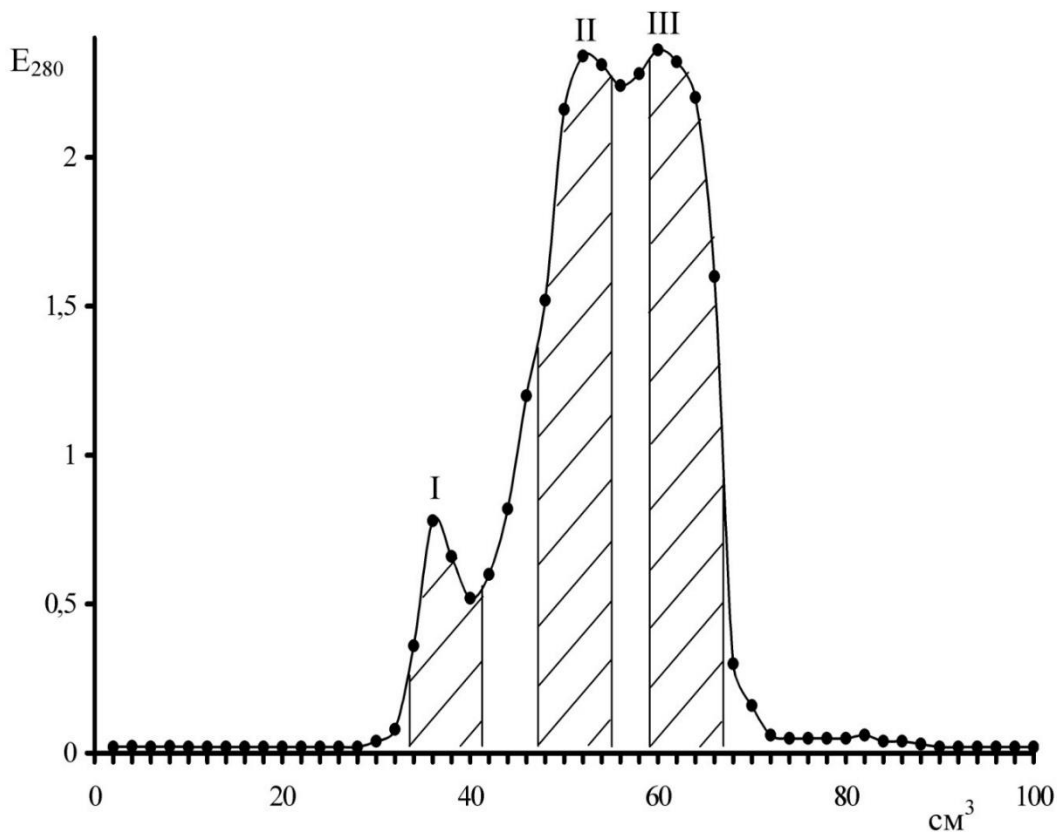


Рисунок 14 – Хроматограма загального казеїну, одержана на сефадексі G-150.

Фракції заштрихованих секторів відбирали для електрофоретичного аналізу

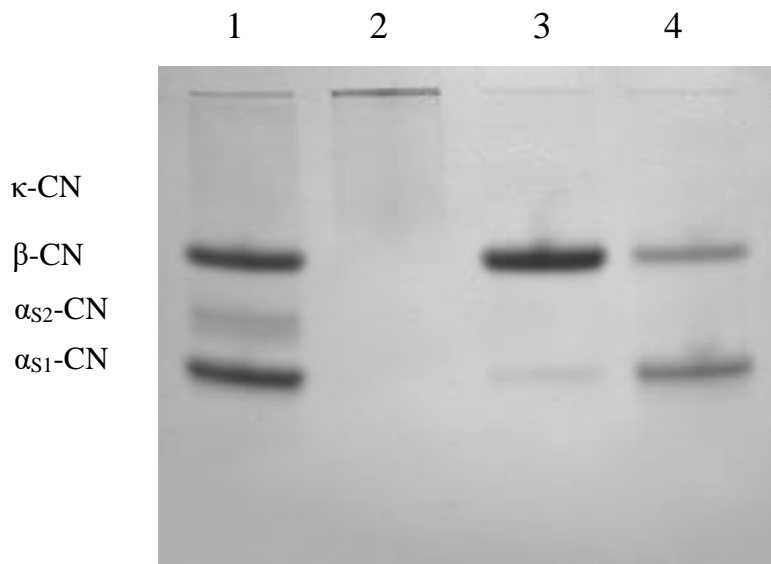


Рисунок 15 – Електрофореграма загального казеїну (1), а також об'єднаних піків I (2), II (3), III (4) після гель-фільтрації на сефадексі G-150 (В. Юкало, 2007)

Запитання для самоконтролю

1. Які можливості надає гель-фільтрація при визначенні складу молока?
2. Які гелі використовують для фракціонування білків молока?
3. Опишіть хроматографічну систему для гель-фільтрації.
4. Опишіть основні стадії проведення гель-фільтрації білків сироватки молока.
5. В чому полягає особливість фракціонування білків казеїнового комплексу методом гель-фільтрації?

Лабораторна робота № 5

ВУГЛЕВОДИ МОЛОКА

Вуглеводи свіжого молока представлені в основному дисахаридом лактозою (~99,7%), а також моносахаридами – глюкозою (~0,15%) і галактозою (~0,15%). Інші вуглеводи – похідні гексоз (глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, галактозо-1-фосфат, глюкозамін, галактозамін) та олігосахариди, виявлені у слідових кількостях. Частина вуглеводів входить до складу глікопротеїнів (κ-казеїн, глікопротеїни сироватки молока та оболонки жирових кульок).

Лактоза є основним вуглеводом молока і практично єдиним джерелом вуглеводів для новонародженого (рис. 16). Вона забезпечує частину енергетичних потреб організму та впливає на формування мікрофлори травного тракту. У технології молочних продуктів лактоза є субстратом для процесів молочнокислого бродіння. Продукт розщеплення лактози – галактоза бере участь в утворенні гангліозидів, які входять до складу оболонок нервових волокон. Інші численні олігосахариди, присутні у молоці у дуже малих кількостях. Їх значення остаточно не встановлено. Частина з них може проявляти біологічну активність і впливати на фізіологічні функції організму.

У молоці відсутні полісахариди. Вони можуть потрапляти у молоко, як продукти життєдіяльності молочнокислих бактерій (декстрини). Такі полісахариди впливають на консистенцію молочних продуктів.

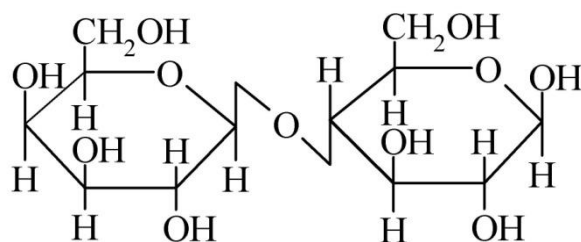


Рисунок 16 – Лактоза (β-форма)

Визначення масової частки лактози

Лактоза в молоці кількісно може бути визначена за допомогою декількох груп класичних фізичних методів (поляриметричні, рефрактометричні) та хімічних методів (гравіметричні, титрометричні, спектрофотометричні).

Поляриметричний метод базується на визначенні кута обертання площини поляризації світла при проходженні його через розчин оптично активних сполук, до яких відноситься лактоза. Величина кута обертання залежить від концентрації оптично активної сполуки. Це дає можливість визначити масову частку лактози. Рефрактометричний метод буде детально розглянутий при виконанні даної лабораторної роботи.

До гравіметричних відноситься метод, який ґрунтується на здатності лактози, як редукуючого дисахариду, відновлювати іони Cu^{2+} у складі реактиву Фелінга (розчин CuSO_4) до Cu^+ у лужному середовищі. При цьому утворюється червоний осад Cu_2O і лактобіонової кислоти. Для розрахунку кількості лактози осад оксиду купруму відфільтровують і зважують. За рівняннями реакції (рис.17) видно, що при окисленні одного моля лактози (360 г) утворюється один моль Cu_2O (143 г).

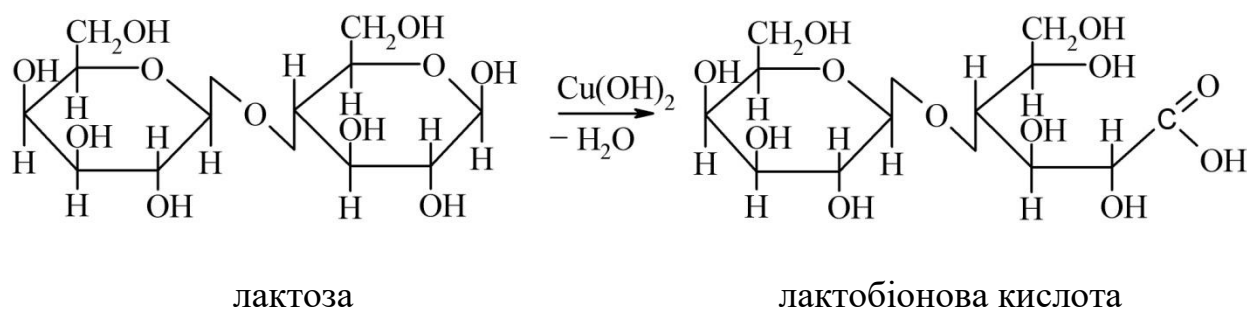


Рисунок 17 – Реакції відновлення іонів купруму лактозою у лужному середовищі

Кількість утвореного Cu_2O також можна визначити титриметрично методом Бертрана. Для цього Cu_2O окиснюють сульфатом феруму до CuSO_4 присутності сульфатної кислоти. Далі отриманий FeSO_4 окиснюють перманганатом калію в кислому середовищі (рис. 18). Кількість Cu_2O встановлюють за об'ємом перманганату калію, який пішов на титрування. Для розрахунку лактози розроблені спеціальні таблиці.

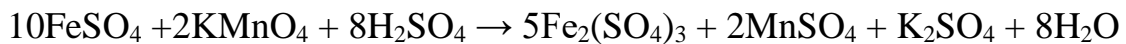
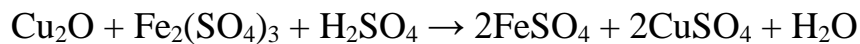


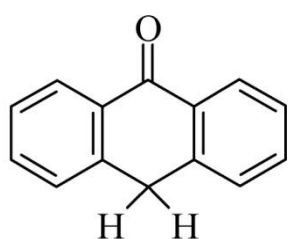
Рисунок 18 – Реакції для визначення кількості Cu_2O за методом Бертрана

Інший важливий титриметричний метод, а саме йодометричний метод визначення лактози, буде далі детально розглянутий при виконанні лабораторної роботи.

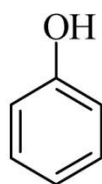
В основу спектрофотометричних (колориметричних) методів покладено кольорові реакції лактози (рис. 19). Одним з найважливіших спектрофотометричних методів є визначення кольорових продуктів реакції лактози з антроном (9, 10-дигідро-9-кетантрацен) при кип'ятінні з 70% сульфатною кислотою. Максимум поглинання продуктів реакції при 625 нм. Метод характеризується високою чутливістю і може використовуватись для визначення лактози у молоці, сирі, сухому молоці. При кип'ятінні розчину лактози з фенолом у присутності сульфатної кислоти утворюються кольорові продукти (фіолетово-коричневі), які можна визначити при довжині хвилі – 480 нм. Для спектрофотометричного визначення лактози також можна використовувати реакцію з гексаціанофератом калію (червона кров'яна сіль – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) у лужному середовищі. При цьому утворюється відновлений жовтий продукт реакції (жовта кров'яна сіль – $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), концентрацію якого вимірюють при 420 нм. Інший метод полягає у взаємодії лактози з

3,5-динітросаліциловою кислотою, яка відновлюється до оранжево-червоної 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти. Забарвленні продукти реакції поглинають при 570 нм.

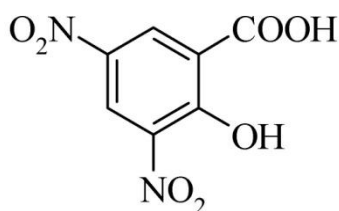
Необхідно також звернути увагу на метод визначення лактози за реакцією з метиламіном і сульфитом натрію. На відміну від інших названих спектрофотометричних методів тут реакція відбувається тільки з лактозою. Інші редукуючі сахариди (глюкоза, галактоза та ін.) не вступають в реакцію і не впливають на результат. Це може бути важливим, коли у молоці або молочному продукті окрім лактози є багато інших редукуючих моно- і олігосахаридів (ферментовані продукти, морозиво, жіноче молоко).



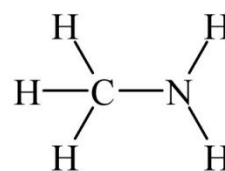
Антрон



Фенол



3,5-динітросаліцилова
кислота



Метиламін

Рисунок 19 – Реагенти для проведення кольорових реакцій з лактозою

Загальним недоліком класичних методів визначення лактози є їх висока трудоемкість і тривалість, необхідність проведення попереднього відділення білків і ліпідів молочного продукту, а також у більшості випадків низька специфічність.

Окрім класичних методів для визначення лактози у промисловості і наукових дослідженнях розроблено декілька груп більш точних і інформативних сучасних методів. До них можна віднести ферментативні, хроматографічні методи та інфрачервону спектроскопію. Необхідно відзначити, що більшість цих методів потребує дорогого обладнання і реактивів.

Інфрачервона спектроскопія широко використовується в аналізаторах молока для визначення концентрації лактози, а також інших його важливих компонентів – білків і ліпідів. Це пов'язано з відмінностями у довжині інфрачервоних хвиль, які поглинають естерні групи атомів ліпідів (5,7 мкм), пептидні групи білків (6,46 мкм) і гідроксильні групи молекули лактози (9,5 або за іншими даними 9,61 мкм).

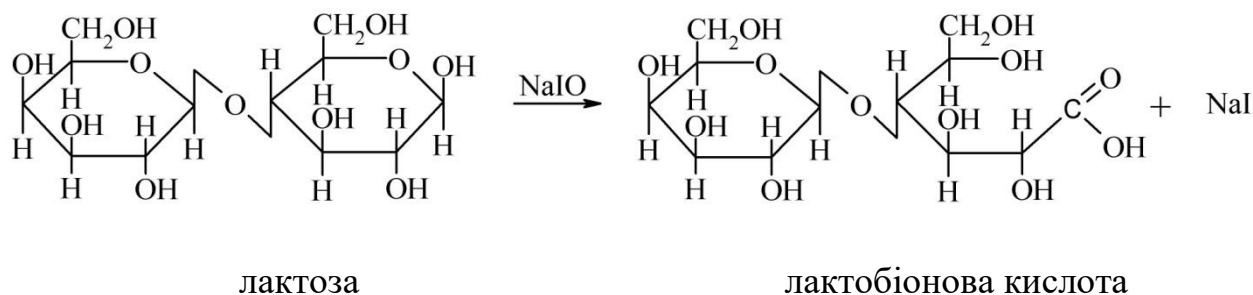
Різні види хроматографії (хроматографія на папері, тонкошарова хроматографія, газова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія окремо і у поєднанні з мас-спектрометрією) дозволяють детально встановити якісний і кількісний склад моно- і олігосахаридів молока і молочних продуктів. Хроматографічні методи використовуються найчастіше при експертній оцінці молочних продуктів і у наукових дослідженнях.

Ферментативні методи характеризуються високою специфічністю і чутливістю. Для визначення концентрації лактози використовують такі ферменти як β -галактозидаза, глюкозо-оксидаза, глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа та галактозо-дегідрогеназа. На основі ферментативних методів розроблені біосенсиори для визначення лактози. Більш детально один із сучасних ферментативних методів буде розглянуто при виконанні даної лабораторної роботи.

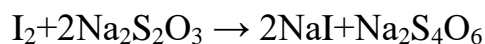
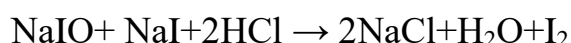
5.1. Визначення масової частки лактози в молоці йодометричним методом (за Г. Крись, 2002)

Метод ґрунтується на окисненні альдегідної групи йодом в лужному середовищі з утворенням лактобіонової кислоти:





Непрореагований йод виділяють додаванням хлоридної кислоти і відтитровують розчином тіосульфату натрію:



Масову частку лактози визначають за різницею між кількістю взятого і невикористаного йоду, який визначають титруванням тіосульфатом натрію. Відомо, що 1 см³ 0,05 моль/см³ розчину тіосульфату еквівалентний 0,01801 г моногідрату лактози або 0,016 г негідратованої лактози.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, реактив Фелінга I (69,25 г перекристалізованого CuSO₄·5H₂O розчиняють у 1 дм³ дистильованої води), розчини NaOH концентрацією 1 моль/дм³ і 0,1 моль/дм³, розчин йоду концентрацією 0,1 моль/дм³, розчин хлоридної кислоти концентрацією 0,5 моль/дм³, 1 % розчин крохмалю, розчин тіосульфату натрію концентрацією 0,1 моль/дм³, фільтрувальний папір, ваги лабораторні технічні 4-го класу точності з наважками, конічні колби (250-300 см³), склянки (50-100 см³), мірні колби (250 см³), піпетки на 2, 5, 10 і 25 см³, бюретки, лійки.

Хід визначення

У мірну колбу місткістю 250 см³ вносять 25 г молока, зваженого з точністю до 0,01 г і додають приблизно 200 см³ дистильованої води. Далі для

осадження білків молока у колбу піпеткою вносять 10 см³ розчину Фелінга I і 4 см³ 1 моль/дм³ розчину NaOH. Суміш ретельно перемішують, доводять до позначки дистильованою водою і знову перемішують і витримують 30 хв для формування осаду білків. Надосадову рідину відфільтровують в колбу.

25 см³ фільтрату, що відповідає 2,5 г молока, відбирають піпеткою і переносять в конічну колбу на 250 см³. Додають 25 см³ 0,1 моль/дм³ розчину йоду і повільно при постійному перемішуванні доливають із бюретки 37,5 см³ 0,1 моль/дм³ розчину гідроксиду натрію. Колбу закривають корком і витримують у темноті протягом 20 хв. Далі додають 10 см³ 0,5 моль/дм³ розчину хлоридної кислоти і титрують йод, який виділився 0,1 моль/дм³ розчином тіосульфату натрію без індикатора до утворення світло-жовтого забарвлення. Після цього додають 1 см³ 1 % розчину крохмалю (індикатор) і продовжують титрувати до зникнення синього забарвлення.

Паралельно проводять контрольний дослід. У мірну колбу (250 см³) вносять 25 см³ води, 25 см³ 1 моль/дм³ розчину йоду, додають при перемішуванні 37,5 см³ 0,1 моль/дм³ розчину NaOH і далі все проводять як у колбі з досліджуваним молоком.

Масову частку лактози (%) у молоці обчислюють за формулою:

$$W_{\text{л}} = \frac{0,01801 \cdot (V_1 - V) \cdot 100 \cdot 0,97}{m}$$

де V_1 – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину тіосульфату натрію, затрачений на титрування йоду у контрольному досліді, см³;

V – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину тіосульфату натрію, затрачений на титрування йоду у фільтраті, см³;

m – маса молока у 25 см³ фільтрату, що дорівнює 2,5 г;

0,97 – поправка, встановлена емпірично.

5.2. Визначення масової частки лактози в молоці рефрактометричним методом (за О. Охріменко, К. Горбатовою, А. Охріменко, 2005)

Метод базується на здатності безбілкової сироватки молока заломлювати промінь світла, який проходить через неї, на певний кут в залежності від концентрації лактози. Значення показника заломлення рефракції молока при 20 °С – n_D^{20} знаходиться в межах від 1,344 до 1,348. Він складається з показника заломлення води – 1,3330, а також лактози, білків молока і солей. Молочний жир, який у молоці знаходиться у вигляді емульсії, на показник заломлення не впливає. При збільшенні масової частки компонентів молока на 1 % приріст показника заломлення складає: для казеїну – 0,00207, для білків сироватки – 0,00187 і для лактози – 0,0014. Приймається, що значення показника заломлення для солей і інших сполук молока є величиною постійною, тому зміна його значення у безбілковій сироватці буде залежати від масової частки лактози.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, 4 % розчин хлориду кальцію, центрифуга лабораторна – ОПН-8, скляні центрифужні пробірки, пробірки, склянки (25 см³), піпетки на 1 і 5 см³, водяна баня, водяний ультратермостат, рефрактометр РЛ-2 з діапазоном вимірювання показника заломлення від 1,33 до 1,54 (рис. 20).

Хід визначення

Масову частку лактози у молоці рефрактометричним методом визначають з використанням безбілкової сироватки. Для отримання безбілкової сироватки у три термостійкі центрифужні пробірки відміряють по 5 см³ молока і додають по 5 крапель 4 % розчину хлориду кальцію. Пробірки закривають корком і ретельно перемішують вміст. Далі пробірки розміщують у водяній бані і нагрівають до кипіння. Після цього в баню заливають холодну воду і

витримують ще дві хвилини. Охолоджені пробірки зрівноважують і центрифугують при 1000 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину обережно відбирають піпеткою і використовують для визначення масової частки лактози.

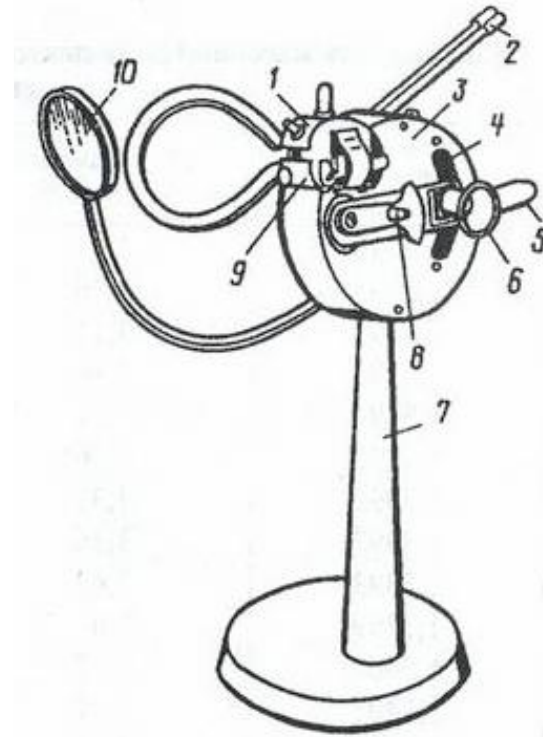


Рисунок 20 – Рефрактометр РЛ-2:

- 1 – верхня призма; 2 – термометр; 3 – корпус; 4 – шкала приладу;
- 5 – ручка для встановлення чіткості при відліку; 6 – окуляр;
- 7 – стійка; 8 – компенсатор; 9 – нижня призма; 10 – дзеркало.

Перед проведенням вимірювання рефрактометр потрібно підготувати. Для цього камери призм приєднують до ультратермостату, термостатують 10 хв при 20°C. Далі проводять перевірку нульової точки приладу. На нижню призму наносять дві краплі дистильованої води і закривають верхню призму. Промінь світла направляють дзеркалом на освітлювальну призму і переміщують окуляр до співпадіння візирної лінії (три штрихи) з границею світлотіні. Границя світлотіні повинна співпадати зі значенням $n_D^{20}=1,333$ на шкалі показників заломлення і нульовим значенням на шкалі сухих речовин. У разі відсутності такого співпадіння необхідно провести регулювання гвинтом, який знаходиться

в корпусі приладу. Для цього необхідно відкрутити гайку на корпусі і спеціальний ключ для гвинта.

Далі камери призм термостатують 10 хв з допомогою ультратермостату при 17,5 °С. Призми протирають сухою тканиною. На нижню призму скляною паличкою наносять декілька крапель безбілкової сироватки і опускають верхню призму. Далі, дивлячись в окуляр, рухом ручки вгору або вниз, суміщають границю між темною і світлою частиною поля зору з пунктирною лінією. Якщо границя не чітка, то необхідно обертанням гвинта компенсатора досягнути різкості. Показник заломлення визначають по лівій шкалі рефрактометра з точністю до 0,0001. При цьому поділка шкали повинна співпадати з пунктирною лінією, суміщеною з границею темного і світлого поля.

Вимірювання проводять тричі. Обчислюють середнє значення і за даними таблиці 6 визначають масову частку лактози у досліджуваному молоці.

Таблиця 6 – Залежність масової частки лактози в молоці від показника заломлення безбілкової сироватки

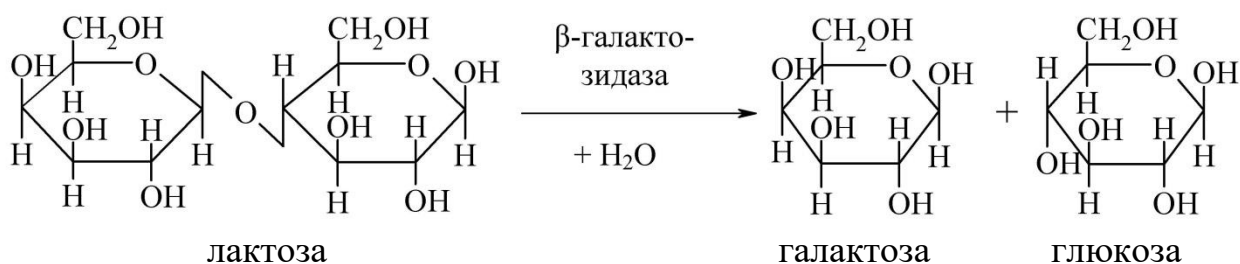
Показник заломлення, n_D^{15}	Масова частка лактози, %	Показник заломлення	Масова частка лактози, %
1	2	3	4
1,3390	3,01	1,3412	4,08
1,3391	3,06	1,3413	4,13
1,3392	3,11	1,3414	4,18
1,3393	3,16	1,3415	4,23
1,3394	3,21	1,3416	4,28
1,3395	3,26	1,3417	4,33
1,3396	3,31	1,3418	4,38
1,3397	3,36	1,3419	4,44
1,3398	3,42	1,3420	4,49

Закінчення таблиці 6

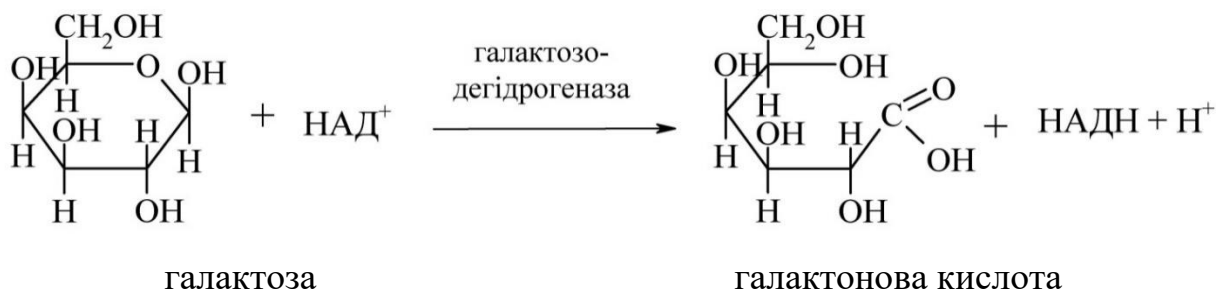
1	2	3	4
1,3399	3,47	1,3421	4,54
1,3400	3,52	1,3422	4,59
1,3401	3,57	1,3423	4,64
1,3402	3,62	1,3424	4,69
1,3403	3,67	1,3425	4,74
1,3404	3,70	1,3426	4,79
1,3405	3,72	1,3427	4,84
1,3406	3,77	1,3428	4,89
1,3407	3,82	1,3429	4,95
1,3408	3,87	1,3430	5,00
1,3409	3,93	1,3431	5,05
1,3410	3,98	1,3432	5,10
1,3411	4,03	1,3433	5,15
		1,3434	5,20

5.3. Ферментативний метод визначення лактози в молоці (на основі стандарту ФРН DIN 10344-82)

Сучасні ферментативні методи відзначаються високою чутливістю і специфічністю. Вони дозволяють визначати лактозу в присутності інших моно- і олігосахаридів. Визначення лактози ферментативним методом проводиться за дві стадії. Спочатку у звільненому від ліпідів і білків молоці за участі ферменту β -галактозидази лактозу гідролізують до глюкози і галактози:



Далі утворену галактозу окиснюють з допомогою ферменту галактозодегідрогенази до галактонової кислоти, а кількість відновленого при цьому нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН) визначають спектрофотометрично:



Якщо у досліджуваному молоці або молочному продукті присутня галактоза, то потрібно її концентрацію визначити до гідролізу лактози β -галактозидазою і це значення відмінусувати від концентрації галактози, обчисленої після гідролізу.

Матеріали, реактиви і обладнання

Молоко, бідистильована вода, розчин ZnSO_4 (30 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 100 см^3 дистильованої води), розчин $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (15 г $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ розчиняють у 100 см^3 дистильованої води), розчин NaOH концентрацією $0,25 \text{ моль/дм}^3$, цитратний буферний розчин рН 6,6 (2,8 г дигідрату тринатрійцитрату, 0,625 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 0,042 г моногідрату лимонної кислоти розчиняють у 40 см^3 дистильованої води; активну кислотність доводять до рН 6,6 2 моль/дм^3 сульфатною кислотою або

0,1 моль/дм³NaOH; об'єм доводять дистильованою водою до 50 см³), фосфатний буфер (8,3 г K₄P₂O₇ розчиняють в 40 см³ бідистильованої води; активну кислотність доводять до рН 8,6 2 моль/дм³ сірчаною кислотою; об'єм розчину доводять до 50 см³ бідистильованою водою), розчин НАД (0,035 г НАД розчиняють в 7 см³ цитратного буферу), суспензія β-галактозидази (0,005 г ліофілізованої β-галактозидази з *E.coli* активністю 150 Е суспендують в 1 см³ розчину (NH₄)₂SO₄ концентрацією 2,2 моль/дм³), суспензія галактозодегідрогенази (0,005 г ліофілізованої β-галактозодегідрогенази з активністю 25 Е змішують з 1 см³ розчину (NH₄)₂SO₄ концентрацією 2,2 моль/дм³), ваги лабораторні з точністю зважування ±0,0001 г, піпетки на 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 см³, колба мірна (100 см³), фільтри паперові, палички скляні, спектрофотометр СФ-46, кварцеві кювети до спектрофотометра, папір індикаторний універсальний.

Хід визначення

Зважують 1,0000* г молока і кількісно переносять у мірну колбу (100 см³). В колбу додають 50 см³ дистильованої води і перемішують. Далі в колбу послідовно додають 1 см³ розчину ZnSO₄ і 1 см³ розчину K₄[Fe(CN)₆] і перемішують. Вміст колби нейтралізують додаванням 0,25 моль/дм³ розчину NaOH. Активну кислотність контролюють з допомогою універсального індикаторного паперу. Після цього об'єм в колбі доводять до позначки, витримують при 20 °С 15 хв і вміст колби фільтрують. При необхідності для отримання прозорого фільтрату проводять повторне фільтрування. Отриманий таким чином фільтрат використовують для визначення в ньому лактози.

Далі проводять контрольні визначення оптичної густини в реакційному середовищі, де фільтрат замінюють дистильованою водою. Для цього в першу кювету спектрофотометра вносять 0,20 см³ розчину НАД в цитратному буфері, 0,02 см³ суспензії β-галактозидази, 1,00 см³ фосфатного буферу (рН 8,6) і

*Маса молока або молочного продукту має бути така, щоб концентрація лактози у фільтраті була в діапазоні від 0,05 до 1,00 г/дм³

2,00 см³ дистильованої води. Вміст кювети перемішують паличкою і витримують при кімнатній температурі протягом 15 хв. Після цього вимірюють оптичну густина E_{K1} при довжині хвилі 334 нм відносно повітря. В кювету додають 0,02 см³ суспензії β -галактозодегідрогенази, перемішують, витримують при кімнатній температурі 30 хв і визначають оптичну густина E_{K2} розчину відносно повітря при довжині хвилі 233 нм.

Враховуючи дуже малу кількість вільної галактози в свіжому коров'ячому молоці в даній роботі вона не буде визначатись. Тому наступним етапом буде визначення лактози. Для цього в кювету спектрофотометра вносять 0,20 см³ розчину НАД в цитратному буфері, 0,1 см³ прозорого фільтрату і 0,02 см³ суспензії β -галактозидази. Вміст кювети перемішують і витримують 15 хв. Далі в кювету додають 1,00 см³ фосфатного буферу (рН 8,6) 1,90 см³ дистильованої води, перемішують і витримують 2 хв. Після цього вимірюють оптичну густина E_1 відносно повітря при довжині хвилі 233 нм. Далі в кювету додають 0,02 см³ суспензії галактозодегідрогінази, перемішують, витримують 15 хв і визначають оптичну густина E_2 відносно повітря при довжині хвилі 233 нм. Оптичну густина продовжують вимірювати через кожні дві хвилини до досягнення постійного значення, що свідчить про завершення реакції.

Масову частку лактози W_L у молоці (г/100 г) обчислюють за формулою

$$W_L = \frac{M_L \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 10^{-4}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_2 \cdot m} \Delta E_L,$$

де M_L – молярна маса лактози (безводна форма), 342,30 г/моль або молярна маса моногідрату лактози 360,31 г/моль;

V_1 – загальний об'єм розчину в кюветі, 3,24 см³;

V_3 – об'єм, отриманий при розведенні взірця молока при його підготовці до визначення лактози, 100 см³;

ε – молярний коефіцієнт поглинання НАДН при довжині хвилі 334 нм – 6,18 дм³·ммоль⁻¹·см⁻¹;

d – товщина поглинаючого шару в кюветі, см;

V_2 – об'єм взірця, 0,10 см³;

m – наважка взірця, г.

$\Delta E_{\text{Л}}$ – зміна оптичної гістини розчину в результаті гідролізу лактози

$$\Delta E_{\text{Л}} = E_2 - E_1$$

За результат приймають середньоарифметичне значення результатів двох паралельних визначень, заокруглених до 0,1 г/100 г.

Запитання для самоконтролю

1. Які вуглеводи входять до складу молока?
2. Якими методами можна визначити масову частку лактози в молоці?
3. Опишіть основні стадії визначення масової частки лактози в молоці йодометричним методом.
4. На чому базується рефрактометричний метод визначення лактози?
5. Опишіть будову рефрактометра РЛ-2 і послідовність роботи на ньому.
6. В чому полягають особливості ферментативного методу визначення лактози в молоці?
7. Опишіть основні стадії ферментативного визначення лактози.

Лабораторна робота № 6

ЛІПІДИ МОЛОКА

У коров'ячому молоці вміст ліпідів становить від 2,8 до 4,2 %. В інших ссавців він може коливатися в межах від 2 до 50 %. Ліпіди молока є основним джерелом енергії для новонароджених. Крім цього, на перших етапах розвитку організму вони забезпечують його незамінними жирними кислотами і жиророзчинними вітамінами (А, D, Е і К). З точки зору технології ліпіди важливі для реології молочних продуктів, а також для формування їх характерного запаху, смаку і кольору. Необхідно відзначити, що вади смаку і запаху теж часто пов'язані з продуктами перетворень ліпідів молока.

Ліпіди молока корови переважно представлені триацилгліцеридами (97-98 %), а також фосфоліпідами (0,6-1,0 %) і стеринами (0,2-0,5 %). Основні представники ліпідів молока показані на рис. 21.

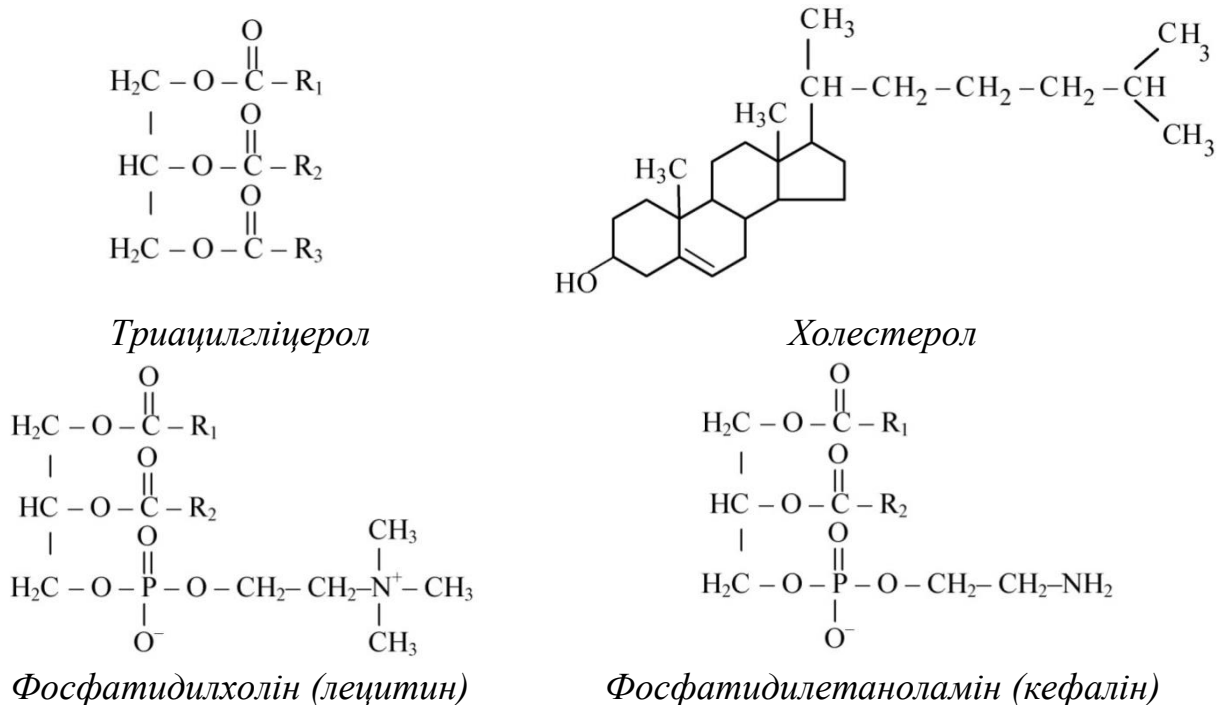


Рисунок 21 – Основні представники ліпідів молока корови: триацилгліцерили (до 98 % від усіх ліпідів молока), холестерол (~95 % від усіх стеринів молока), лецитин і кефалін (~35 % і 32 % від усіх фосфоліпідів молока відповідно)

У малих кількостях присутні також продукти гідролізу триацилгліцеролів – диацилгліцероли (~ 0,36 %), моноацилгліцероли (~ 0,027 %) і вільні жирні кислоти (~ 0,027 %). У слідових кількостях до складу молочного жиру входять такі полярні ліпіди, як цереброзиди, гангліозиди, цераміди. Фосфоліпіди і інші полярні ліпіди переважно знаходяться у мембранах жирових кульок.

У складі ліпідів коров'ячого молока знайдено близько 400 різних видів жирних кислот. Більшість з них присутні у слідових кількостях. Вміст і характеристика основних жирних кислот коров'ячого молока представлені у табл. 7.

Для коров'ячого жиру характерна відносно велика кількість коротколанцюгових жирних кислот (зокрема бутанової) – до 10 % і більше, якщо оцінювати їх молярний вміст. Це пов'язано з особливостями синтезу бутанової кислоти мікроорганізмами у жуйних і безпосереднім включенням їх до складу триацилгліцеролів. Визначення вмісту бутанової кислоти є важливим критерієм автентичності жиру коров'ячого молока. Також коротколанцюгові жирні кислоти у вільному стані (після гідролізу ацилгліцеролів) здатні суттєво погіршувати смак і запах молока і масла.

У жирі коров'ячого молока низький вміст поліненасичених жирних кислот (ПНЖК). Це пов'язано з діяльністю мікроорганізмів, які гідрогенізують ПНЖК кормів у травному тракті корів. Проте вміст середньоланцюгових жирних кислот, які синтезуються у клітинах молочної залози, відносно високий. ПНЖК у коров'ячому молоці переважно знаходяться у вигляді цис-ізомерів (до 95 %). Такі ізомери мають нижчу температуру плавлення. Лінолева і ліноленова кислоти відносяться до незамінних і не можуть синтезуватися в організмі корів. Вони поступають з кормами.

До складу естерів холестеролу, фосфоліпідів і інших полярних ліпідів входять довголанцюгові насичені і ненасичені жирні кислоти.

Таблиця 7 – Характеристика основних жирних кислот молока
(за П. Фокс, 2015)*

Скорочені позначення	Структура	Системна назва	Тривіальна назва	Температура плавлення, °С	Поріг запаху, мг/кг	Вміст, %
Насичені						
C _{4:0}	CH ₃ (CH ₂) ₂ -COOH	Бутанова	Масляна	-7,9	0,5-10	3,3
C _{6:0}	CH ₃ (CH ₂) ₄ -COOH	Гексанова	Капронова	-3,9	3	1,6
C _{8:0}	CH ₃ (CH ₂) ₆ -COOH	Октанова	Каприлова	16,3	3	1,3
C _{10:0}	CH ₃ (CH ₂) ₈ -COOH	Деканова	Капринова	31,3	10	3,0
CH _{12:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ -COOH	Додеканова	Лауринова	44,0	10	3,1
CH _{14:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ -COOH	Тетрадеканова	Міристинова	54,0		9,5
CH _{16:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ -COOH	Гексадеканова	Пальмітинова	62,9		26,3
CH _{18:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ -COOH	Октадеканова	Стеаринова	69,6		14,6
Ненасичені						
<i>Родина ω9</i>						
16:1	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH- CH ₂ -(CH ₂) ₆ -COOH	Δ9-гексадецена	Пальміт-олеїнова	0,5		2,3
18:1	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH- CH ₂ -(CH ₂) ₆ -COOH	Δ9-октадецена	Олеїнова	13,4		29,8
<i>Родина ω6</i>						
18:2	CH ₃ (CH ₂) ₄ - (CH=CH-CH ₂) ₂ - (CH ₂) ₆ -COOH	Δ9,12- октадекадієнова	Лінолева	-5,0		2,4
18:3	CH ₃ (CH ₂) ₄ - (CH=CH-CH ₂) ₃ - (CH ₂) ₃ -COOH	Δ6,9,12- октадекатриєнова	γ-Ліноленова			0,8**
20:4	CH ₃ (CH ₂) ₄ - (CH=CH-CH ₂) ₄ - (CH ₂) ₂ -COOH	Δ5,8,11,14- ейкозатетраєнова	Арахідонова	-49,5		Сліди
<i>Родина ω3</i>						
18:3	CH ₃ -CH ₂ - (CH=CH-CH ₂) ₃ - (CH ₂) ₆ -COOH	Δ9,12,15- октадекатриєнова	α-Ліноленова	-11,0		

*Жирні кислоти C_{4:0}-C_{10:0} – розчинні у воді, а C_{4:0}-C_{12:0} – леткі.

**Сума γ- і α- ліноленові.

Фізико-хімічні властивості молочного жиру

Для характеристики жирів використовують фізичні і хімічні числа або константи. До них відносяться фізичні числа: температура плавлення і твердіння, показник заломлення; а також хімічні числа: число омилення, йодне число, число Рейхерта-Мейссля, число Поленське. Оскільки склад ліпідів молока гетерогенний і непостійний, то всі числа являють собою певні інтервали.

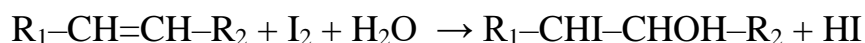
Температура плавлення вказує діапазон температур, при яких молочний жир переходить у рідкий стан і стає прозорим (27-34°C).

Температура твердіння вказує діапазон температур, при яких молочний жир переходить з рідкого у твердий стан (18-23°C).

Значення показника заломлення жиру залежить від вмісту високомолекулярних і ненасичених жирних кислот. Цим вищий їх вміст – тим більший показник. Для молочного жиру його значення знаходиться у діапазоні 1,453-1,456.

Число омилення дорівнює масі гідроксиду калію (мг), яка витрачається на нейтралізацію всіх жирних кислот, що утворюються після омилення 1 г молочного жиру. Значення числа омилення пов'язане з молекулярною масою жирних кислот. Чим менша молекулярна маса жирних кислот, тим вище значення числа омилення. Для молочного жиру воно знаходиться у діапазоні 220-234.

Йодне число використовується для визначення ступеня ненасиченості жирних кислот. Виражають його у кількості I₂, який реагує з 100 г жиру у реакції:



Для молочного жиру значення йодного числа залежить від кормів, пори року, породи і знаходиться у діапазоні – 28-45.

Число Рейхерта-Мейссля характеризує вміст низькомолекулярних жирних кислот (масляної і капронової), які є одночасно і розчинними і леткими. Воно дорівнює кількості (см³) 0,1 моль/дм³ гідроксиду натрію, що використовується для нейтралізації цих кислот у 5 г молочного жиру. Цей показник у першому наближенні може свідчити про натуральність молочного жиру. Для молочного жиру він становить 20-34 мл. У інших жирів його значення значно менше і не перевищує 9 см³.

Число Поленське характеризує вміст летких, але нерозчинних у воді жирних кислот молочного жиру (каприлова, капринова і лауринова). Має менше значення для практичного використання оскільки у кокосовому і пальмоядровому жирі вміст цих кислот ще вищий.

Для порівняння показники найбільш поширених харчових жирів наведені у таблиці 8.

Таблиця 8 – Фізико-хімічні властивості харчових жирів

(за К. Горбатовою, 2001; О. Чагаровським, Н. Ткаченко, Т. Лисогор, 2013)

Вид жиру або олії	Температура, °С		Йодне число	Число омилення	Число Рейхерта-Мейссля
	плавлення	твердіння			
Молочний	27-34	18-23	28-45	220-234	20,0-34,0
Яловичий	42-52	30-38	32-47	190-200	0,25-0,5
Свинячий	36-42	26-32	41-66	193-203	0,3-0,9
Баранячий	44-55	33-45	31-46	192-198	0,1-1,2
Кокосовий	20-28	14-25	8-12	251-264	4,0-8,0
Пальмоядровий	25-30	19-24	12-20	240-257	4,0-7,0
Пальмовий	31-41	27-30	48-58	196-210	0,4-1,5
Соняшникова	-	-16 - -19	119-145	186-194	До 0,6
Бавовняна	-	0 - -6	100-116	189-199	0,2-1,0
Кукурудзяна	-	-10- -25	111-133	187-190	0-2,5
Оливкова	-	0 - -6	72-89	185-200	0,2-1,0
Соєва	-	-15- -18	120-140	180-195	0,5-0,8
Рапсова	-	0 - -10	95-106	171-180	<0,8

Визначення вмісту жиру

Для кількісного визначення жиру в молоці і молочних продуктах використовують декілька методичних підходів. Це в першу чергу поширений кислотний метод, який був запропонований С. Бебкою у 1890 році і довгий час використовувався в США. У 1891 році Н. Гербер вдосконалив метод С. Бебкока завдяки використанню окрім сульфатної кислоти бутанолу. Цей метод став основним у визначенні молочного жиру в Європі.

Друга важлива група методів базується на екстракції молочного жиру різними органічними розчинниками. Це метод Ф. Сокслета (1879 р.), метод Б. Розе (1884 р.) в модифікації Е. Готліба (1892 р.) і метод Т. Монсоньє (1922 р.). Два останні з модифікаціями використовуються до сьогоднішнього дня.

В 60-х роках минулого століття почали застосовувати турбідиметричні методи. Турбідиметричні методи основані на вимірюванні ступеня розсіяння світлового потоку шаром жирових кульок. Для того, щоб кульки були однакового розміру, проводиться гомогенізація молока. Для виключення впливу білків (в першу чергу казеїнових міцел) на світлорозсіяння використовують спеціальні розчинники. З 70-х років набули поширення методи, які базуються на поглинанні інфрачервоних променів ($\lambda = 5,7$ мкм). Суттєвою перевагою цих методів є швидкість проведення аналізу і відказ від застосування агресивних і шкідливих реагентів.

В наукових дослідженнях для встановлення детального складу ліпідів молока (особливо мінорних компонентів) використовують сучасні хроматографічні методи (газова хроматографія, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія), високоспецифічні ферментативні методи.

6.1. Визначення масової частки жиру в молоці і молочних продуктах кислотним методом (на основі ГОСТ 5867-90)

Суть кислотного методу (методу Гербера) полягає в руйнуванні білкової оболонки жирових кульок молока сульфатною кислотою. Далі вміст жирових кульок (молочний жир) звільняється і за участі ізоамілового спирту об'єднується при нагріванні. Після центрифугування вимірюється об'єм жирової фази за шкалою жироміра.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, кислота сульфатна (густина 1810-1820 кг/м³), ізоаміловий спирт, жироміри скляні типу 1-6 або 1-7 з гумовими корками (рис. 22), піпетки, дозатори на 1 см³ (для ізоамілового спирту) і на 10 см³ (для сульфатної кислоти), центрифуга для вимірювання масової частки жиру в молоці і молочних продуктах (рис. 23), водяні бані, штатив для жиромірів, ваги лабораторні 4-го класу точності, термометри (0-100 °С), циліндри (50 і 100 см³), ареометр з діапазоном вимірювання від 700 до 2000 кг/м³, секундомір.

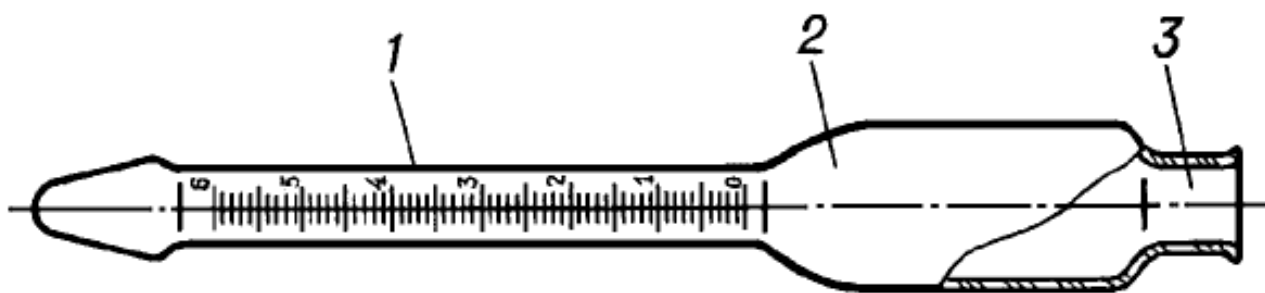


Рисунок 22 – Жиромір скляний (бутирометр):

1 – шкала с ціною поділки 0,1%; 2 – резервуар для молока; 3 – отвір для корка

Приготування сульфатної кислоти з необхідною густиною (1810-1820 кг/м³)

Для цього в кислоті, яка є в лабораторії вимірюють ареометром густину. За табл. 9 визначають її концентрацію. Об'єм води (V_{H_2O}), необхідний для розбавлення кислоти, обчислюють за формулою:

$$V_{H_2O} = V_1 \left(\frac{d_1 \cdot c_1}{d_2 \cdot c_2} - 1 \right),$$

де V_1 – об'єм кислоти, яку необхідно розбавити, см³;

d_1 – густина кислоти, яку необхідно розбавити, г/см³;

c_1 – концентрація кислоти, яку необхідно розбавити, %;

d_2 – густина кислоти після розбавлення, г/см³;

c_2 – концентрація H_2SO_4 в кислоті після розбавлення, %.

Якщо відомий потрібний об'єм розбавленої кислоти V_2 , то об'єм води для розбавлення обчислюють за формулою:

$$V_{H_2O} = V_2 \left(1 - \frac{d_2 \cdot c_2}{d_1 \cdot c_1} \right),$$

а об'єм кислоти, яку потрібно розбавити, визначають за формулою:

$$V_1 = V_2 - V_{H_2O}.$$

Таблиця 9 – Залежність концентрації сульфатної кислоти від її густини

Густина, г/см ³	Концентрація H ₂ SO ₄ , %	Густина, г/см ³	Концентрація H ₂ SO ₄ , %	Густина, г/см ³	Концентрація H ₂ SO ₄ , %
1,814	90,05	1,820	91,25	1,832	94,60
1,815	90,20	1,822	91,70	1,833	95,00
1,816	90,40	1,825	92,30	1,834	95,60
1,817	90,60	1,827	92,75	1,835	97,00
1,818	90,80	1,829	93,43	1,838	99,70
1,819	91,00	1,831	94,25	1,839	99,95

При розбавленні кислоти вливають у воду у термостійкому посуді. Після розбавлення отриману кислоту охолоджують до 20°C і вимірюють густину ареометром. Густина має велике значення при визначенні жиру в молочних продуктах. Якщо густина сульфатної кислоти менша від 1810 кг/м³, то жир повністю не виділяється і відсутня чітка лінія розділу. Якщо густина більша, ніж 1820 кг/м³, то може відбуватися обуглення білків і потемніння рідини.



Рисунок 23 – Центрифуга для вимірювання масової частки жиру в молоці і молочних продуктах

Хід визначення жиру в молоці

Взірець молока ретельно перемішують і нагрівають до 20 °С. Два жироміри розміщують у штативі і дозатором наливають по 10 см³ сульфатної

кислоти (густиною від 1810 до 1820 кг/м³). При цьому стараються не замочити горловину жироміра. Далі обережно, щоб не відбулося змішування рідин, піпеткою додають 10,77 см³ молока, прикладаючи кінчик піпетки до горловини жироміра під кутом. Рівень молока в піпетці встановлюють за нижньою точкою меніска. Молоко з піпетки повинно витікати повільно. Після звільнення піпетки її витягують з горловини жироміра не швидше, чим через 3 с. Видувати молоко з піпетки не дозволяється. Далі в жиромірі додають по 1 см³ ізоамілового спирту. Рівень суміші в жиромірі встановлюють на 1-2 мм нижче від основи горловини жироміра. Для цього в жиромір можна додати декілька крапель дистильованої води. Жироміри закривають сухими корками, вводячи їх трохи більше, ніж наполовину в горловину жироміра. Для повного розчинення білків молока і перемішування вмісту жироміри перевертають не менше п'яти разів.

Далі жироміри прогривають (корками вниз) 5 хв у водяній бані при 65 °С. Після цього жироміри вставляють у касети центрифуги градуйованою частиною до центру симетрично один проти другого. Центрифугу закривають кришкою і центрифугують 5 хв з частотою обертів від 1000 до 1200 об/хв.

Після завершення центрифугування жироміри виймають із центрифуги і, рухаючи корок, регулюють стовпчик жиру так, щоб він знаходився у градуйованій частині жироміра. Жироміри далі занурюють корками вниз у баню на 5 хв при температурі 65°С так, щоб рівень води в бані був вище, ніж рівень жиру в жиромірі. Жироміри виймають із водяної бані і швидко роблять підрахунок жиру. При цьому жиромір тримають вертикально і границя жиру повинна бути на рівні очей. Рухаючи корок, встановлюють нижню границю стовпчика на нульовому або цілому значенні шкали. Від цього значення відраховують число поділок до нижньої точки меніска стовпчика жиру з точністю до найменшої поділки шкали. Границя розподілу жиру і кислоти повинна бути чіткою, а стовпчик жиру прозорим. Покази жироміру відповідають масовій частці жиру в молоці у відсотках. Десять малих поділок жироміру відповідає одному відсотку жиру. Відлік проводять з точністю до

однієї малої поділки. За результат вимірювань приймають середнє арифметичне значення двох паралельних спостережень. Розходження між ними не повинно перевищувати значень, які вказані у табл. 10.

Таблиця 10 – Межі допустимої похибки результатів вимірювань для вірогідності 90 %

Вид продукту	Межі допустимої похибки, масової частки жиру (\pm)			
	При вимірюванні об'єму проби піпеткою		При вимірюванні маси проби вагами	
	Тип жироміра		Тип жироміра	
	1-6; 1-7	2-0,5	1-6; 1-7	1-40
Молоко і молочні продукти без цукру	0,08	–	0,065	0,30
Молочні продукти з цукром	0,08	–	0,075	0,40
Сир плавлений	–	–	0,83	–
Сир сичужний	–	–	1,1	–
Масло вершкове з наповнювачами	–	–	–	1,2
Молоко знежирене	–	0,03	–	–

Хід визначення жиру в молочних продуктах

Кислотний метод може застосовуватися для визначення масової частки жиру в рідких молочних продуктах. Для цього вводять певні поправки, які узагальнені у табл. 11. Далі розглянемо особливості (окрім вказаних у табл. 11) ходу визначення жиру в окремих продуктах.

Кисломолочні продукти, вершки, молозиво. Продукти зважують (з точністю до 0,005 г), вносять у жиромір, при потребі додають воду, сульфатну кислоту і ізоаміловий спирт. При визначенні жиру у вершках, сметані, кисломолочному сири, сиркових виробках і морозиві перед

центрифугуванням проводять підігрівання жиромірів з досліджуваною сумішшю у водяній бані із струшуванням до повного розчинення білка. При дослідженні вершків, сметани і молочного морозива рівень суміші у жиромірі встановлюють на 4-5 мм нижче від основи горловини жироміра, а при визначенні жиру у вершковому морозиві і пломбірі – на 6-10 мм. Покази жироміра при визначенні жирності кисломолочних продуктів, вершків (з масовою часткою жиру не більше 40 %), вершкового морозива і пломбіру відповідають масовій частці жиру в цих продуктах у відсотках.

Таблиця 11 – Особливості визначення масової частки жиру в різних молочних продуктах кислотним методом

Назва продукту	Тип жироміра	Об'єм, маса зразка для аналізу	Об'єм добавленої води, см ³	Густина сульфатної кислоти, кг/м ³	Об'єм сульфатної кислоти, см ³	Кількість центрифугувань	Збіжність, % масової частки жиру, не більше
1	2	3	4	5	6	7	8
Молоко всіх видів, крім нежирного, негомогенізоване	1-6; 1-7	10,77 см ³ ; 11,00 г	–	Від 1810 до 1820	10	1	0,1
Молоко всіх видів, крім нежирного, гомогенізоване	1-6; 1-7	10,77 см ³ ; 11,00 г	–	Від 1810 до 1820	10	3	0,1
Кисломолочні продукти із негомогенізованого молока	1-6; 1-7	11,00 г	–	Від 1810 до 1820	10	1	0,1
Кисломолочні продукти із гомогенізованого молока, в т.ч. для дитячого харчування	1-6; 1-7	11,00 г	–	Від 1810 до 1820	10	3	0,1
Вершки негомогенізовані і сметана із негомогенізованих вершків з масовою часткою жиру не більше 40 %; сир кисломолочний, сиркові вироби без цукру	1-40	5,00 г	5	Від 1810 до 1820	10	1	0,5
Вершки негомогенізовані з масовою часткою жиру більше 40 %;	1-40	2,50 г	7,5	Від 1810 до 1820	10	1	1,0
Вершки гомогенізовані і сметана із гомогенізованих вершків	1-40	5,00 г	5	Від 1810 до 1820	10	3	0,5
Сиркові вироби з цукром	1-40	5,00 г	5	Від 1800 до 1810	10	1	0,5

Закінчення таблиці 11

1	2	3	4	5	6	7	8
Морозиво молочне і любительських видів з масовою часткою жиру не більше 5 %, із гомогенізованої суміші	1-6; 1-7	5,00 г	–	Від 1500 до 1550	16	4	0,2
Морозиво вершкове і любительських видів з масовою часткою жиру від 5 до 10 %, із гомогенізованої суміші	1-6; 1-7 1-40	5,00 г	–	Від 1500 до 1550	16	4	0,2 0,5
Морозиво вершкове і любительських видів з масовою часткою жиру від 5 до 10 %, із негомогенізованої суміші	1-6; 1-7 1-40	5,00 г	–	Від 1500 до 1550	16	1	0,2 0,5
Морозиво пломбір і любительських видів з масовою часткою жиру більше 10 %	1-6; 1-7 1-40	4,00 г 5,00 г	–	Від 1500 до 1550	16	4	0,3 0,5
Сири сичужні плавлені	1-6; 1-7	1,50 г	–	Від 1500 до 1550	19	1	0,7
Масло вершкове з наповнювачами	1-40	2,50 г	–	Від 1500 до 1550	16	1	1,0
Масло вершкове без наповнювачів (виробничий метод), крім солоного масла	–	–	–	–	–	–	0,3
Молоко нежирне і маслянка	2-0,5 2-1,0	10,77×2 см ³	–	Від 1810 до 1820	20	3	0,02 0,05
Сироватка (після сепарування)	2-0,5	10,77×2 см ³	–	Від 1780 до 1800	20	3	0,02

Масову частку жиру (X) у відсотках у молочному морозиві обчислюють за формулою:

$$X = \frac{P \cdot 11}{M},$$

а у вершках з масовою часткою жиру більше 40 % за формулою:

$$X = \frac{P \cdot 5}{M},$$

де P – середнє арифметичне значення результатів двох паралельних спостережень, %;

M – маса наважки, г;

11 і 5 – маса наважок продуктів, які використовують для градування жиромірів (11 – для жиромірів 1-6, 1-7; 5 – для жиромірів 1-40), г.

Сири сичужні і плавлені. Зважують в два жироміри по 1,5 г сиру з точністю до 0,005 г, додають дозатором по 10 см³ сульфатної кислоти. Далі доливають по (9±1) см³ сульфатної кислоти так, щоб рівень рідини був від 4 до 6 мм нижче основи горловини жироміра. Дозатором додають в жироміри по 1 см³ ізоамілового спирту. Далі жироміри закривають корками і розміщують їх у водяній бані з температурою 65 °С. Там їх витримують при частому струшуванні до повного розчинення білків. Це може тривати близько 60 хв. Якщо білок погано розчиняється, то можна при повторному визначенні підвищити температуру водяної бані до 73 °С. Відлік показів жироміра при цьому проводять після витримки у водяній бані при температурі 65°С протягом п'яти хвилин. Масову частку жиру (X) в сирі обчислюють за формулою:

$$X = \frac{P \cdot 11}{M},$$

де P – середнє арифметичне значення результатів двох паралельних спостережень з врахуванням вимог табл. 11, %;

M – маса наважки, г;

11 – маса наважки, яка використовувалася для градування жироміра, г.

Масло з наповнювачами. Зважують у два жироміри по 2,5 г масла з точністю до 0,005 г, додають по 10 см³ сульфатної кислоти. Далі ще доливають по (6±1) см³ сульфатної кислоти так, щоб рівень рідини був на 4-6 мм нижче від основи горловини жироміра. Дозатором додають в жироміри по 1 см³ ізоамілового спирту. Закривають жироміри корками і витримують у водяній бані, постійно струшуючи при температурі 65°С до повного розчинення білків. Масову частку жиру обчислюють за формулою, як для вершків з масовою часткою жиру більше 40 %.

Молоко нежирне, маслянка. В два жироміри, горловини яких зі сторони градуйованої частини закриті корками, обережно, не змочуючи горловину, вносять сульфатну кислоту. Потім по два рази в кожен жиромір вносять взірець

продукту з допомогою піпетки місткістю 10,77 см³. Додають дозатором по 2 см³ ізоамілового спирту, закривають великими корками і струшують до повного розчинення білків. При цьому жироміри періодично перевертають. Далі жироміри встановлюють великим корком вниз на 5 хв у водяну баню (65 °С). Після прогрівання у водяній бані жироміри встановлюють у центрифугу градуйованою частиною до центру і центрифугують три рази по 5 хв або два рази по 10 хв. Між центрифугуванням жироміри термостатують по 5 хв у водяній бані при температурі 65 °С. Після першого центрифугування для регулювання рівня жиру малий корок трошки відкривають і великим корком встановлюють верхній рівень рідини в градуйованій частині жироміра. Потім менший отвір закривають. Одного центрифугування для відліку жиру не достатньо. Тільки після третього центрифугування витягують із жиромірів маленькі корки, розміщують на 5 хв у водяну баню при 65 °С і слідкують, щоб рівень рідини не піднімався вище поділок шкали. Після прогрівання жиромір дістають з бані, регулюючи великим корком, встановлюють нижню границю жиру на нульовій або найближчій цілій позначці і швидко проводять відлік жиру так, як для молока і кисломолочних продуктів.

6.2. Визначення масової частки жиру в молоці гравіметричним методом (на основі ДСТУ ISO 1211:2002)

Принцип методу був розроблений Б. Розе (1884 р.) і пізніше модифікований Е. Готлібом (1892 р.). Він полягає в екстрагуванні діетиловим і петролейним етерами аміачно-спиртового розчину досліджуваного взірця молока. Амоніак сприяє розчиненню білків молока, що полегшує розчинення жиру етерами. Петролейний етер не змішується з водою. Цим самим він не допускає переходу водорозчинних компонентів молока у жирову фазу. Етиловий спирт утримує у водній фазі багато спирторозчинних компонентів

молока. Після проведення екстракції розчинники видаляють дистиляцією або випаровуванням і визначають масу молочного жиру.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко; розчин амоніаку (25 %); етиловий спирт; розчин Конго червоного у воді (1 %); діетиловий етер і петролейний етер (перед використанням їх змішують в однакових об'ємах); аналітичні ваги з ціною поділки 0,1 мг; центрифуга, в яку встановлюють колби або пробірки для центрифугування жиру з частотою обертання від 500 до 600 об./хв; дистиляційний або випарний апарат для дистилювання розчинників і етилового спирту; сушильна шафа, що здатна підтримувати температуру $(102 \pm 2)^\circ\text{C}$; водяна баня; колби Можоньє (рис. 24) з корками із силіконової гуми або політетрафторетилену (корки перед використанням очищують діетиловим етером, витримують у воді за температури 60°C 15 хв і охолоджують у воді для того, щоб під час використання вони були насичені водою); штатив для колб для екстрагування жиру; скляна промивалка для змішаного розчинника; посуд ємкістю від 125 до 250 см³; знежирений непористий фарфор або карбід кремнію; мірні циліндри (5 і 25 см³); піпетки (10 см³); щипці для фіксування колб; мірна колба (100 см³).

Хід визначення

В колбі для екстрагування жиру відважують 10-11 г досліджуваної проби з точністю до 1 мг. Пробу вміщують в нижній відсік колби, додають 2 см³ розчину амоніаку і ретельно перемішують у нижньому відсіку. Додають 10 см³ етилового спирту і перемішують, дозволяючи вмісту колби протікати між малим і великим відсіками. Не дозволяється допускати, щоб рідина потрапляла занадто близько до горла колби (для чіткішої видимості поверхні розділу фаз можна додати 2 краплі розчину Конго червоного). Далі додають 25 см³ діетилового етеру, закривають колбу для екстрагування корком і інтенсивно

струшують протягом 1 хв. При цьому колбу тримають горизонтально, періодично переливаючи рідину з великого відсіку у малий. Обережно виймають корок і промивають його та горло колби невеликою кількістю розчинника так, щоб вся рідина стікала в колбу. Далі додають 25 см³ петролейного етеру. Закривають колбу для екстрагування корком, перемішують (30 с) і струшують її вміст. Закриту колбу можна центрифугувати протягом 1-5 хв або відстоювати у штативі (30 хв). В результаті жирова фаза (верхній шар) стане прозорою і чітко відокремиться від нижньої (водної фази). Після цього обережно виймають корок, промивають його і горло колби змішаним розчинником. Якщо поверхня розділу між фазами знаходиться нижче циліндричної частини колби, її піднімають вище цього рівня, обережно доливаючи воду по стінці колби. Далі колбу для екстрагування тримають за малий відсік і обережно зливають максимальну кількість жирової фази у довгогорлу плоскодонну колбу із шматочками знежиреного непористого фарфору, що забезпечує спокійне кипіння рідини під час випаровування розчинників. Зливання водної фази не допускається.

Після промивання горла колби змішаним розчинником в неї додають 5 см³ етилового спирту. Для другого екстрагування додають 15 см³ діетилового етеру і 15 см³ петролейного етеру. Діетилловим етером споліскують внутрішню частину горла колби. За необхідності піднімають поверхню розділу фаз до середини циліндричної частини колби доливанням води. Решту операцій проводять як при першому екстрагуванні.

Третє екстрагування проводять без додавання етилового спирту, використовуючи лише 15 см³ діетилового етеру і 15 см³ петролейного етеру. Решту операцій проводять як при першому екстрагуванні. В кінці третього екстрагування за необхідності піднімають поверхню розділу фаз до середини циліндричної частини колби, додаючи акуратно воду по стінці колби (рис. 24), щоб максимально провести остаточне зливання жирової фази (рис. 25).

З колби для збирання жирової фази максимально видаляють розчинники (етери і етиловий спирт) дистиляцією. Критерієм повноти дистиляції може служити відсутність запахів розчинників. Після цього колбу для збирання жиру нагрівають в горизонтальному положенні в сушильній шафі при 102 °С протягом 1 години для випаровування розчинника. Жир після цього повинен бути прозорий. Колбу охолоджують і зважують. Далі знову нагрівають у сушильній шафі до 102°С протягом 30 хв, охолоджують і зважують. Процедуру нагрівання, охолодження і зважування повторюють поки маса колби для зважування жиру не зменшиться на 1,0 мг або менше або збільшиться між двома послідовними зважуваннями. За кінцевий результат приймають досягнуту найменшу масу колби з екстрагованим жиром.

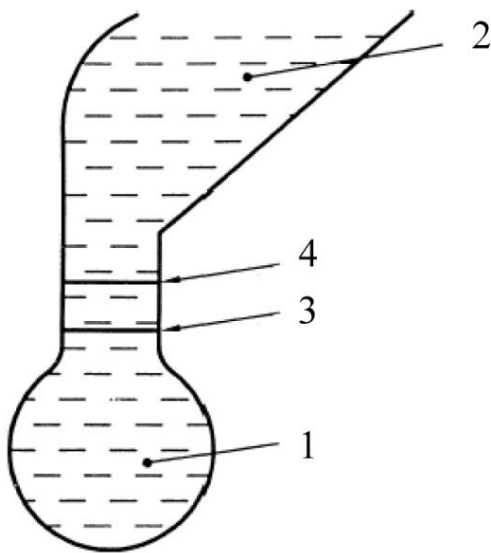
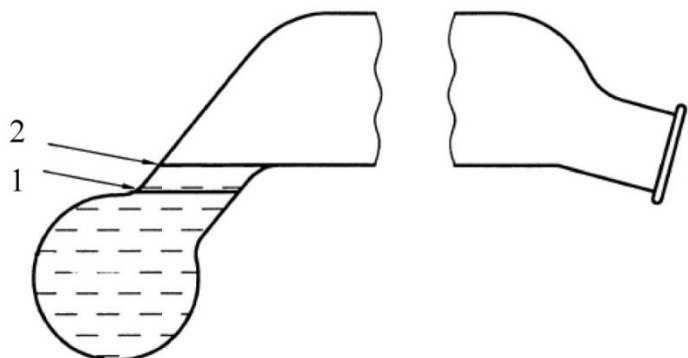


Рисунок 24 – Положення поверхні розділу фаз в колбі Можоньє після екстракцій:

- 1 – водна фаза; 2 – жирова фаза;
- 3 – поверхня розділу фаз під час першого екстрагування;
- 4 – поверхня розділу фаз під час третього екстрагування

Рисунок 25 – Положення поверхні розділу фаз в колбі Можоньє під час зливання жирової фази після першого екстрагування (1) і після другого та третього екстрагування (2)



Одночасно проводять «сліпий» дослід, використовуючи ту саму методику і ті самі реактиви, але досліджувану пробу замінюють 10 см³ води.

Вміст жиру в пробі обчислюють, використовуючи формулу:

$$W_f = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \cdot 100\%,$$

де W_f – масова частка жиру в пробі, %;

m_0 – маса досліджуваної проби, г;

m_1 – маса колби для збирання жиру і екстрагованої речовини, г;

m_2 – маса підготовленої колби для збирання жиру, г;

m_3 – маса колби для збирання жиру і екстрагованої речовини, яку використовували в «сліпому» досліді, г;

m_4 – маса колби, яку використовували в «сліпому» досліді, г.

Результат округлюють до другого знаку після коми.

Запитання для самоконтролю

1. Які ліпіди входять до складу молочного жиру?
2. Охарактеризуйте особливості жирнокислотного складу ліпідів молока.
3. Які фізико-хімічні показники використовують для характеристики молочного жиру?
4. Якими методами визначають масову частку жиру в молоці і молочних продуктах?
5. Опишіть основні стадії визначення масової частки жиру в молоці кислотним методом.
6. В чому полягають особливості визначення масової частки жиру кислотним методом в різних молочних продуктах?
7. На чому ґрунтується визначення масової частки жиру гравіметричним методом? Опишіть основні стадії визначення.

Лабораторна робота № 7

МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ І ВІТАМІНИ МОЛОКА

7.1. Макро- і мікроелементи молока

Поділ на макро- і мікроелементи досить умовний. У біохімії (О. Столяр, 2014) до макроелементів відносяться елементи, масова частка кожного з яких в організмі людини становить більше 0,001 % (разом – це близько 99,9 % маси тіла людини). До макроелементів відносять O, C, H, N, P, Cl, S, Ca, K, Na, Mg, Fe, Zn, Rb. Мікроелементи (Cu, Mn, Co, Cr, J, Br, Mo, V, Si, Se) знаходяться в межах від 0,001 до 0,000001%, а представники окремої групи ультрамікроелементів (Pb, Ag, Ni, Hg, Au, Cs) у кількостях, що не перевищують 0,000001 %. При характеристиці потреб людини у харчових речовинах до макроелементів їжі відносять: P, K, Ca, Cl, Na, Mg. Іноді до них відносять: Si і S.

Ми не будемо розглядати макроелементи органічних біомолекул – C, H, N, O, S. У молоці вони в основному є у складі білків, вуглеводів і ліпідів. Решта елементів у молоці знаходяться у вигляді іонів, або солей органічних і неорганічних кислот. Вміст макро- і мікроелементів у коров'ячому і жіночому молоці в організмі людини та добова потреба в них наведені у табл. 12. У значних кількостях у молоці присутні катіони Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} та аніони фосфатної, карбонатної, хлоридної, сульфатної та лимонної кислот. Вміст аніонів лимонної, хлоридної, карбонатної (в перерахунку на CO_2) та сульфатної кислот становить у середньому відповідно 1750, 1000, 200 і 100 мг/дм³. Решта елементів (за різними даними від 20 до 50) знайдені у молоці у слідових кількостях. Очевидно, що більша частина з них є есенціальними і виконує певні біологічні функції. Інші (неесенціальні) – можуть попадати у молоко випадково. Це питання ще остаточно не зв'язовано.

Таблиця 12 – Вміст макро- і мікроелементів у коров'ячому і людському молоці, організмі людини та добова потреба

Елемент	Середній вміст у молоці* (П. Фокс, 2015)		Добова потреба дорослого чоловіка вагою 70 кг** (А. Ленінджер,1985)	Вміст (%) в організмі людини (О. Столяр, 2014)
	корови	людини		
Макроелементи				
Калій	1450	690	4000	0,35
Кальцій	1200	320	800	1,0
Хлорид	1000	210	1500	0,15
Фосфор (заг.)	950	–	800	1,0
Фосфор (неорган.)	750	90	–	–
Натрій	500	100	1000	0,15
Магній	130	30	350	0,036
Ферум	–	–	–	0,0042
Цинк	–	–	–	0,0033
Рубідій	–	–	–	0,0017
Мікроелементи				
Цинк	3500	2950	15000	–
Силіцій	2600	700	–	< 0,001
Ферум	500	760	10000	–
Йод	260	70	150	< 0,001
Купрум	200	390	3700	0,00014
Станум	170	–	–	–
Ванадій	~150	7	–	< 0,001
Флуор	~125	77	3000	–
Молибден	73	8	–	< 0,001
Арсен	45	50	–	–
Селен	36	14	–	< 0,001
Манган	30	12	–	0,000029
Нікол	25	25	–	< 0,000001
Хром	10	40	–	0,000009
Кобальт	1	12	–	0,000007

Примітки: *вміст макроелементів у мг/дм³, а мікроелементів у мкг/дм³;

**потреба у макроелементах у мг, а мікроелементів у мкг

Як видно з даних табл. 12, співвідношення елементів у коров'ячому і людському молоці подібне. Проте, загальний вміст макро- і мікроелементів у

людському молоці у 3-4 рази нижчий, ніж у коров'ячому. Відповідно, після спалювання коров'ячого молока утворюється 0,7-0,8 % золи, а молока людини – 0,2 %. Необхідно відзначити, що склад золи не відповідає реальному складу солей молока. При спалюванні органічні кислоти переходять у карбонати, втрачається частина фосфатів з летким P_2O_5 і т. д.

Основною функцією мінеральних сполук молока є забезпечення потреб організму у постнатальний період в макро- і мікроелементах (табл. 13). Крім цього, у молоці солі виконують наступні функції:

- 1) підтримка електронейтральності молока;
- 2) підтримка ізотонічності молока і крові;
- 3) катіони кальцію і аніони ортофосфатної кислоти беруть участь у формуванні казеїнових міцел.

Таблиця 13 – Біологічні функції макро- та мікроелементів молока

Елемент	Біологічні функції
1	2
Кальцій	Входить до складу кісток і зубів у вигляді гідроксил-апатиту $[Ca_3(PO_4)_2]_3 \cdot Ca(OH)_2$. Регуляторні процеси. Кофактор багатьох ферментів.
Фосфор	У вигляді фосфатів входить до складу гідроксилапатиту кісток і зубів, нуклеїнових кислот, фосфопротеїнів, фосфоліпідів, АТФ та інших фосфоровмісних біомолекул. Енергетичний обмін. Регуляторні процеси. Підтримка рН (фосфатна буферна система).
Магній	Входить до складу кісток. Кофактор багатьох АТФ-залежних реакцій (гліколіз). Впливає на формування імунітету.
Калій, Натрій	Підтримка водно-електоролітного та кислотно-лужного балансу.

Продовження таблиці 13

1	2
Цинк	Входить до складу простетичних груп близько 300 ферментів (ДНК- і РНК-полімерази, карбоксипептидази, алкогольдегідрогенази, та ін.). Утворює комплекс з інсуліном. Бере участь у функціонуванні рецепторів запаху і смаку.
Силіцій	Кремнійорганічні сполуки у кістковій і сполучній тканині.
Ферум	Входить до складу залізо-порфіринових білків (гемоглобін, міоглобін, цитохроми). Транспорт кисню. Окиснювальне фосфорилування.
Йод	Входить до складу тиреоїдних гормонів щитовидної залози.
Купрум	Входить до складу простетичних груп цитохромоксидази, активного центру лізілоксидази та інших ферментів. Участь у процесах засвоєння феруму. Окиснювальне фосфорилування.
Станум	Необхідний для процесів кальцифікації кісток.
Ванадій	Входить до складу активного центру флавіндегідрогеназ.
Флуор	У вигляді фторпатиту $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{CaF}_2$ входить до складу кісток і зубів, що забезпечує їх міцність і кислотостійкість.
Молібден	Функціонує у складі простетичних груп ферментів (альдегідоксидаза, ксантинооксидаза).
Селен	Функціонує у складі простетичних груп ферментів (глутатіонпероксидаза).
Манган	Кофактор ферментів (аргіназа).
Хром	Процеси регуляції засвоєння глюкози тканинами тварин.
Кобальт	Входить до складу вітаміну B_{12} .

Макроелементи в організмі найчастіше виконують декілька функцій (структурна функція, підтримування водно-електролітного та кислотно-лужного балансу, регуляторна функція, участь у біохімічних реакціях, процеси транспорту, утворення трансмембранного потенціалу, формування та передача нервових імпульсів). Мікроелементи у більшості випадків входять до складу кофакторів, а також вітамінів. Остаточно потреба організму в різних мікроелементах та їх функції ще не встановлені.

Сольова рівновага у молоці

Солі, утворені сильними кислотами (H_2SO_4 , HCl) і сильними основами (NaOH , KOH) у молоці знаходяться у повністю дисоційованому стані. Солі слабких кислот (фосфати, цитрати і карбонати) можуть бути у вигляді різних іонів залежно від рН. Альфред Тьопел пропонує для приблизного підрахунку співвідношення концентрацій таких іонів використовувати константи дисоціації слабких кислот. Проведення аналогічних розрахунків для інших рівноважних станів показало, що фосфати в молоці знаходяться в основному у вигляді гідрофосфатів (HPO_4^{2-}) і частково – дигідрофосфатів ($\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$), карбонати в основному у вигляді гідрокарбонатів (HCO_3^{1-}), а цитрати переважно у вигляді моногідроцитратів і цитратів.

Складові частини солей молока розподілені між фазою істинного розчину (іони, молекули, комплексні сполуки) і колоїдною фазою (агрегати фосфатів і цитратів, казеїнат кальцію). За даними А. Тьопела близько 33 % кальцію, 53 % фосфатів, 75 % мангану і 90 % цитратів у свіжому молоці знаходиться в істинному розчині. У колоїдній фазі близько 67 % всього кальцію і 47 % фосфатів. Тому колоїдні неорганічні солі часто називають колоїдним кальцій фосфатом (ККФ), хоча там присутня частина іонів натрію, калію, магнію і цитрату. ККФ асоційований з казеїновими міцелами.

Д. Шмідт (1982 р.), базуючись на тому, що кількість Ca , зв'язаного казеїном, еквівалентна кількості фосфатних груп, аргументував, що ККФ

найбільш імовірно є аморфним трикальцій фосфатом $[Ca_3(PO_4)_2]$. Це наступні аргументи:

1. Фосфосеринові залишки казеїну є потенційними сайтами для взаємодії з ККФ (це було підтверджено на дентині і фосфопротеїнах слюни).

2. У казеїновій міцелі (10^8 Да), яка містить 93,3 % казеїну, є 0,83 % залишків фосфатів, тобто 25000 фосфатних груп. У такій міцелі 70600 атомів кальцію і 30100 залишків неорганічних фосфатів, з яких може бути сформовано 5000 кластерів $Ca_9(PO_4)_6$. Залишається 25500 атомів кальцію. Це означає, що приблизно один атом кальцію на одну фосфосеринову групу і приблизно 40% цих фосфосеринових груп попарно можуть бути зв'язані з $Ca_9(PO_4)_6$ кластерами. Електростатичні взаємодії між фосфосериновими групами, кластерами $Ca_9(PO_4)_6$ і двома атомами кальцію не приводять до утворення кристалів. Схема будови міцели і розміщення колоїдного кальцій фосфату показана на рис. 26.

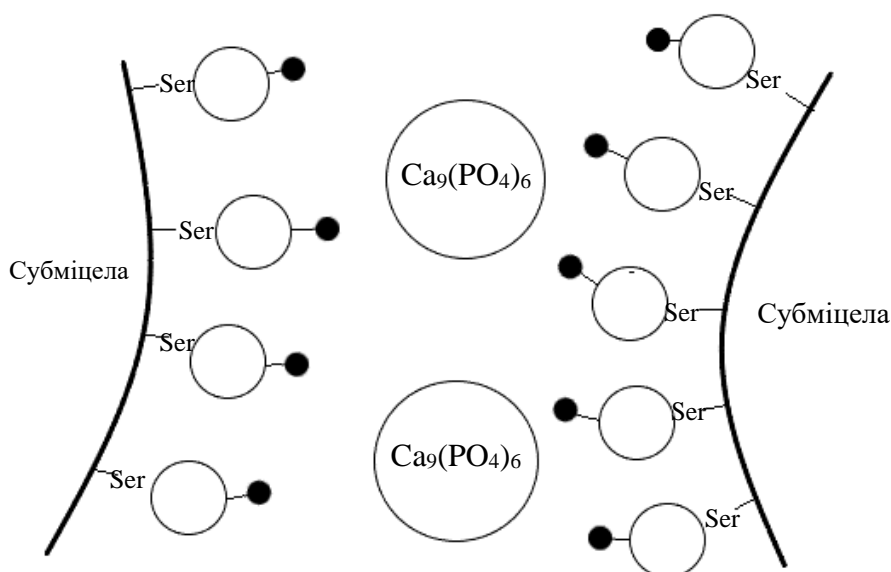


Рисунок 26 – Асоціація колоїдного кальцій фосфату $Ca_3(PO_4)_2$ з фосфосериновими групами казеїну: ● – Ca, ○ – PO_4 (Д. Шмідт, 1982)

На основі досліджень з використанням ЯМР, рентгенівської та інфрачервоної спектроскопії, Хольт (1998, 2013, 2014 р.р.) запропонував, що ККФ має структуру, подібну до брушиту – $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

ККФ становить лише $\sim 6\%$ сухої ваги казеїнової міцели, але відіграє важливу роль у її структурі і властивостях. Без ККФ молоко втрачає здатність коагулювати за дії молокозсідальних ферментів, змінюється стійкість до дії іонів кальцію і нагрівання.

Баланс між колоїдною і розчинною фазою залежить від багатьох факторів: температури, концентрування, розбавлення, додавання кислот, лугів солей, термічної обробки та ін. Схематичний вплив різних факторів на сольову рівновагу у молоці показано на рис. 27.

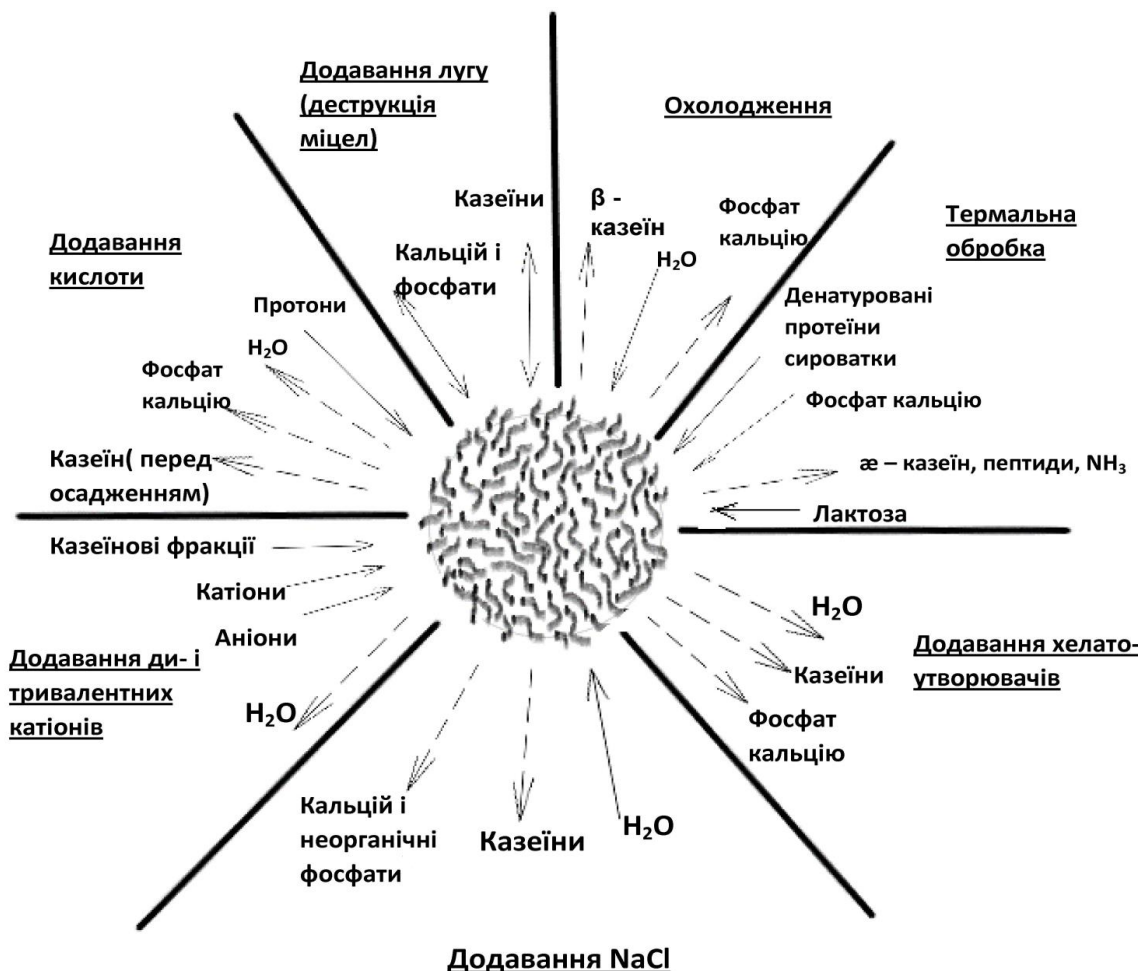


Рисунок 27 – Вплив різних факторів на сольову рівновагу у молоці (Ф. Гавчерон, 2011)

Значення макро- і мікроелементів та солей для біохімічних процесів у молоці

Найбільше значення для біохімічних процесів молока має кальцій. Він присутній у молоці у вигляді іонів Ca^{2+} (~ 10 %), фосфатів і цитратів (~ 68 %) і у складі казеїну (~ 22 %). Іони кальцію відіграють значну роль у формуванні структури казеїнових міцел. Встановлено, що величина казеїнових міцел прямо залежить від концентрації іонів кальцію. Підчас видалення іонів кальцію у процесі діалізу молока казеїнові міцели розпадаються на субміцели. Також казеїнові міцели розпадаються при зв'язуванні іонів кальцію трилоном Б. Молоко при цьому стає світлішим. Концентрація іонів кальцію є важливою для процесів ферментативної коагуляції молока. В нормі – це 110 мг іонів кальцію на 1 дм³ молока. При недостатній концентрації іонів Ca^{2+} (< 80 мг/дм³) молоко погано зсідається (сичужно-в'яле). Для прискорення коагуляції і покращення реологічних властивостей згустку при виробництві твердих сирів, до молока разом із молокозсідальним препаратом, додають CaCl_2 . Для виробництва плавленого сиру додають солі-плавителі. Головна їхня функція – зв'язування кальцію з утворенням кальцій-фосфатних і кальцій-цитратних комплексів. У результаті утворюється пластичний казеїнат натрію. Це дозволяє емульгувати жир і досягнути характерної консистенції плавленого сиру. Вміст кальцію впливає на розчинність сухого молока і казеїну.

До 82 % усього магнію молока знаходиться у фазі істинного розчину. Іони магнію (Mg^{2+}) становлять приблизно 16 %. Решта – у складі фосфатів, цитратів і казеїну.

Натрій і калій у молоці знаходяться переважно у вигляді іонів Na^+ і K^+ . Вони відіграють важливу роль у підтримці осмотичного тиску та функціонуванні буферних систем молока (фосфатна, карбонатна).

Мікроелементи молока (манган, ферум, цинк, кобальт та ін.) відіграють важливу роль у розвитку мікрофлори заквасок при виробництві сирів і

ферментованих молочних продуктів. Деякі з них є кофакторами природних ферментів молока. Іони Cu^{2+} і Fe^{2+} стимулюють біохімічні процеси згіркнення молочного жиру, що призводить до формування вад смаку масла.

Методи визначення мінеральних речовин

Мінеральний склад молока і молочних продуктів можна визначити після їх мінералізації нагріванням до 500-600 °С близько чотирьох годин. Проте такий метод не завжди може забезпечити об'єктивність результатів. Це пов'язано з втратою летких компонентів і переходом частини органічних сполук в неорганічні. Тому для різних неорганічних іонів розроблені спеціальні методи кількісного аналізу (табл. 14).

Таблиця 14 – Методи визначення мінеральних речовин в молоці

№ з/п	Сполука або іон	Метод визначення
1	Кальцій (Ca^{2+})	1. Комплексонометричний метод з використанням трилону Б. 2. Атомно-адсорбційна спектроскопія фільтратів після осадження білків 12% трихлороцтовою кислотою
2	Неорганічні фосфати	Метод Фіске і Суббароу
3	Магній (Mg^{2+})	Комплексонометричний метод з використанням трилону Б
4	Натрій (Na^+) Калій (K^+)	1. Полум'яна фотометрія 2. Атомно-адсорбційна спектроскопія 3. Аналіз з використанням іонселективних електродів
5	Хлориди (Cl^-)	4. Титриметричний метод з використанням AgNO_3
6	Сульфати (SO_4^{2-})	Гравіметричний метод з використанням BaCl_2
7	Цитрати	1. Колориметричний метод 2. Ферментативний метод

7.1.1. Визначення масової частки кальцію в молоці комплексометричним методом (за О. Охріменко, К. Горбатовою, А. Охріменко, 2005)

Суть методу полягає у здатності іонів кальцію утворювати стійкі комплексні сполуки з трилоном Б (динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) у лужному середовищі при використанні індикатора мурексиду (пурпурат амонію). При цьому утворюється комплекс іонів кальцію з мурексидом і бузковий колір мурексиду змінюється на слабо рожевий колір мурексид-кальцієвого комплексу. Під час титрування розчину трилоном Б мурексид-кальцієвий комплекс розпадається і утворюється більш стійкий трилон Б-кальцієвий комплекс.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, розчин гідроксиду натрію (2 моль/дм³), індикаторна суміш мурексиду (в ступку вносять 0,25 г мурексиду, 12,5 г хлориду натрію і ретельно розтирають), 1 % розчин фенолфталеїну (в конічну колбу вносять 1 см³ фенолфталеїну, 70 см³ 95 % етанолу, розчиняють і додають 29 см³ дистильованої води і все перемішують), 0,1 моль/дм³ розчин трилону Б (в мірну колбу на 1000 см³ вносять 18,61 г трилону Б, розчиняють спочатку в малій кількості дистильованої води, доводять до позначки дистильованою водою і перемішують), конічні колби на 300 см³, піпетки на 5, 10 і 50 см³, циліндр на 200 см³, бюретка місткістю 10 см³, секундомір.

Хід визначення

В конічну колбу (300 см³) вносять 95 см³ дистильованої води, 5 см³ розчину гідроксиду натрію (2 моль/дм³) і 0,04 г індикаторної суміші мурексиду, і вміст колби ретельно перемішують. Рідина в колбі забарвлюється в бузковий колір. Далі в колбу вносять 5 см³ досліджуваного молока. Вміст колби

обережно перемішують (без утворення піни) і витримують у спокої 2 хв. При цьому рідина у колбі знебарвлюється або стає слабо рожевого кольору. Після витримки вміст колби титрують розчином трилону Б (1 моль/дм³) до утворення бузкового забарвлення. Зазначають об'єм реактиву, який пішов на титрування і додають ще краплю трилону Б. Якщо забарвлення розчину не змінюється, титрування завершують, а в розрахунках використовують попередній об'єм реактиву.

Масову частку кальцію (ω) в молоці визначають за формулою:

$$\omega = \frac{V \cdot 2 \cdot 0,97}{V_M \cdot \rho \cdot 10^{-3}} 100 \text{ (мг \%)},$$

де V – об'єм розчину трилону Б, який був використаний для титрування, см³;

V_M – об'єм молока, взятого для дослідження, см³;

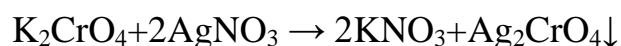
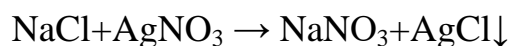
ρ – густина молока, кг/м³;

2 – маса кальцію, яка відповідає 1 см³ розчину трилону Б з еквівалентною концентрацією 0,1 моль/дм³, мг;

0,97 – поправка на об'єм білків і жиру.

7.1.2. Визначення масової частки хлоридів в молоці (за О. Охріменко, К. Горбатовою, А. Охріменко, 2005)

Метод визначення масової частки хлоридів у молоці базується на взаємодії іонів Cl⁻ з нітратом аргентуму з утворенням нерозчинного осаду хлориду аргентуму. Як індикатор в даній реакції використовують хромат калію. За відсутності хлоридів хромат калію взаємодіє з нітратом срібла з утворенням осаду хромату срібла, який має червоно-коричнєве забарвлення:



Білки молока, які впливають на хід визначення хлоридів, попередньо видаляють висолюванням сульфатом алюмінію. Крім цього, при взаємодії сульфату алюмінію з гідроксидом натрію утворюються аморфні частинки гідроксиду алюмінію, які адсорбують білкові агрегати і сприяють висолюванню.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, 20 % розчин сульфату алюмінію (в колбу вносять 20,00 г сульфату алюмінію і 80 см³ дистильованої води, перемішують до повного розчинення), гідроксид натрію 2 моль/дм³ (в мірну колбу на 1000 см³ вносять 140 см³ прозорого насиченого розчину гідроксиду натрію і доводять до позначки свіжокип'яченою і охолодженою до 20 °С дистильованою водою), гідроксид натрію 0,1 моль/дм³ (в мірну колбу на 1000 см³ вносять 7 см³ прозорого насиченого розчину гідроксиду натрію і доводять до позначки свіжокип'яченою і охолодженою до 20 °С дистильованою водою), 1 % розчин фенолфталеїну (в конічну колбу вносять 1,0 см³ фенолфталеїну і 70 см³ етанолу, розчиняють і додають 29 см³ дистильованої води), 10 % розчин хромату калію (в конічну колбу вносять 10,00 г хромату калію і додають 90 см³ дистильованої води, перемішують до повного розчинення), нітрат аргентуму 0,02817 моль/дм³ (в мірну колбу на 1000 см³ вносять 4,788 г нітрату аргентуму, розчиняють в дистильованій воді і доводять нею до позначки), мірна колба на 200 см³, піпетки на 10, 20 і 50 см³, конічні колби місткістю 150 і 300 см³, бюретка на 25 см³, термометр, фільтрувальний папір, лійки.

Хід виконання

В мірну колбу ємкістю 200 см³ піпеткою вносять 20 см³ досліджуваного молока, 10 см³ 20 % розчину сульфату алюмінію і 8 см³ розчину гідроксиду

натрію (2 моль/дм³). Вміст колби перемішують і доводять до позначки дистильованою водою. При цьому відбувається висолування білків. Отриманий осад білків відділяють фільтруванням через паперовий фільтр. Отриманий фільтрат при потребі доводять до нейтрального значення рН додаванням гідроксиду натрію (0,1 моль/дм³). Значення контролюють додаванням 2-3 крапель 1 % фенолфталеїну.

Далі в конічну колбу місткістю 150 см³ піпеткою вносять 50 см³ нейтралізованого фільтрату, доливають 1 см³ 10 % хромату калію і титрують розчином нітрату аргентуму (0,02817 моль/дм³) до слабкого червоного забарвлення. Під час титрування можна орієнтуватися на ореол цегляного кольору, який утворюється в місці падіння краплі нітрату аргентуму в розчин. Титрування вважають закінченим, якщо ореол більше не утворюється. Відзначають об'єм розчину нітрату аргентуму, який був витрачений на титрування.

Масову частку хлоридів (ω) у молоці обчислюють за формулою:

$$\omega = \frac{V \cdot l}{V_M \cdot \rho \cdot 10^{-3}} 100 \text{ (мг\%)},$$

де V – об'єм розчину нітрату аргентуму, витраченого на титрування, см³;

l – маса хлоридів, яка відповідає 1 см³ розчину нітрату аргентуму з еквівалентною концентрацією 0,02817 моль/дм³, мг;

V_M – об'єм молока, який відповідає 50 см³ фільтрату, см³ ($V_M = 50 \text{ см}^3$);

ρ – густина молока, кг/м³;

7.2. Вітаміни молока

До вітамінів належать низькомолекулярні представники різних класів органічних сполук, які у малих кількостях абсолютно необхідні для життєдіяльності. Назву «вітаміни» ввів К. Функ, який виділив перший вітамін – тамін. Вітаміни не синтезуються в організмі і тому повинні потрапляти в нього з їжею. Вони відносяться до незамінних компонентів їжі.

Відкриття різних вітамінів відбулося значно раніше, ніж були встановлені механізми їх функціонування. Тому, спочатку їх просто розділяли на дві групи за фізичними властивостями, а саме здатністю розчинятися у воді і жирі. Таким чином виникла група жиророзчинних вітамінів (А, D, Е і К) та водорозчинних (В₁, В₂, В₃, РР, Н, В₆, В_с, В₁₂ і С). Необхідно відзначити, що вказані вітаміни є незамінними для харчування людини. Для тварин потреби у вітамінах можуть відрізнятися. Так, для більшості тварин аскорбінова кислота не є вітаміном. Вона може синтезуватися у їхніх організмах з глюкози. По мірі вивчення вітамінів було встановлено, що водорозчинні вітаміни є кофакторами, або складовими частинами кофакторів різних ферментів. Також до кофакторів відноситься один жиророзчинний вітамін – К. Інші жиророзчинні вітаміни беруть участь у різних важливих біологічних процесах – таких як сприйняття світлових квантів (вітамін А), кальцифікація кісткової тканини (вітамін D), антиоксидантний захист ліпідів клітинних мембран (вітамін Е).

Очевидно, що молоко містить всі необхідні вітаміни для розвитку організму у постнатальний період. Проте ці потреби можуть відрізнятися у людини і тварин, а також у немовлят та дорослих людей. У табл. 15 наведені дані про вміст вітамінів у коров'ячому і людському молоці, а також добові потреби у вітамінах дорослої людини. Видно, що молоко людини і корови аналогічне за складом вітамінів, але відрізняється кількісним співвідношенням окремих вітамінів. Це необхідно враховувати при створенні замінників жіночого молока для годування немовлят. В деяких країнах проводяться спроби

покращення вітамінного складу молока. Очевидно до цього потрібно підходити з обережністю оскільки ще не встановлені всі функції вітамінів. Так, лише недавно було показано, що вітамін D швидше можна віднести до гормонів. Також виявилось, що він може синтезуватись в організмі.

Таблиця 15 – Вміст вітамінів у молоці, добові потреби у вітамінах і їх функції

Вітамін	Вміст у молоці мкг/100 мл (П. Фокс, 2015)		Добова потреба дорослого мужчини вагою 70 кг, мкг (А. Ленінджер, 1885)	Біологічна функція
	корови	людини		
1	2	3	4	5
Жиророзчинні вітаміни				
Вітамін А (ретинол)	62	155	1000	Фоторецепторна функція у зоровому процесі
Вітамін Д (кальциферол)	0,03		5	Регуляція кальцій- фосфатного обміну
Вітамін Е (токоферол)	0,1	1,3	10000	Антиоксидантний захист ліпідів мембран
Вітамін К (філохінон)	0,35-1,8	0,025	80	Реакції карбоксилування
Водорозчинні вітаміни				
Вітамін В ₁ (тіамін)	37	15	1400	Реакції декарбоксилування α -кетокислот
Вітамін В ₂ (рибофлавін)	180	38	1600	Окисно-відновні реакції
Вітамін РР (ніацин, нікотинова кислота , В ₅)	90	170	18000	Окисно-відновні реакції

Закінчення таблиці 15

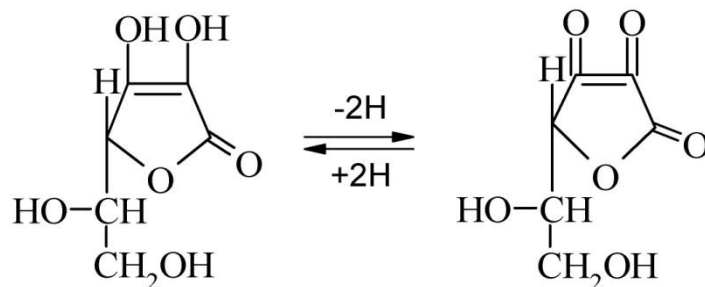
1	2	3	4	5
Вітамін Н (біотин, В ₇)	4	1	225	Реакції карбоксилування
Вітамін В ₃ (пантотенова кислота)	350	270	7500	Реакції з переносом ацильних груп
Вітамін В ₆ (піридоксин)	36	14	2200	Реакції переносу аміногруп (трансамінування)
Вітамін В _С (фолієва кислота)	7	8	400	Реакції з переносом однокарбонових груп (-СН ₃ , -СН ₂ -, -СН=, -СНО та ін.)
Вітамін В ₁₂ (кобаламін)	<1	<1	3	Внутрішньо-молекулярний або міжмолекулярний перенос атома водню
Вітамін С	1000	7000	60000	Реакції гідроксилування. Окисно-відновні реакції

У молоці водорозчинні вітаміни знаходяться у плазмі молока, а жиророзчинні у складі жирових кульок (переважно в їх оболонках). Вітаміни не впливають на технологічні процеси виробництва молочних продуктів. Виключенням є вітамін А, який має відношення до формування кольору молока і молочних продуктів. З іншого боку, технологічні процеси можуть призводити до втрати вітамінів молока. Тому важливо враховувати стійкість вітамінів до дії різних факторів (рН, температура, світлові промені, концентрація кисню) при виробництві молочних продуктів. Наведені у табл. 15 дані – це середні величини для молока. Вміст вітамінів у молоці залежить від умов годування тварин, породи, періоду лактації, віку та стану здоров'я.

Для кожного вітаміну розроблені методи для його якісного і кількісного визначення. У молоці найчастіше визначають вміст аскорбінової кислоти (на основі реакції відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу), а також тіаміну (вітамін В₁) і рибофлавіну (вітамін В₂) флуориметричним методом.

7.2.1. Визначення вітаміну С в молоці (за О. Охріменко, К. Горбатовою, А. Охріменко, 2005)

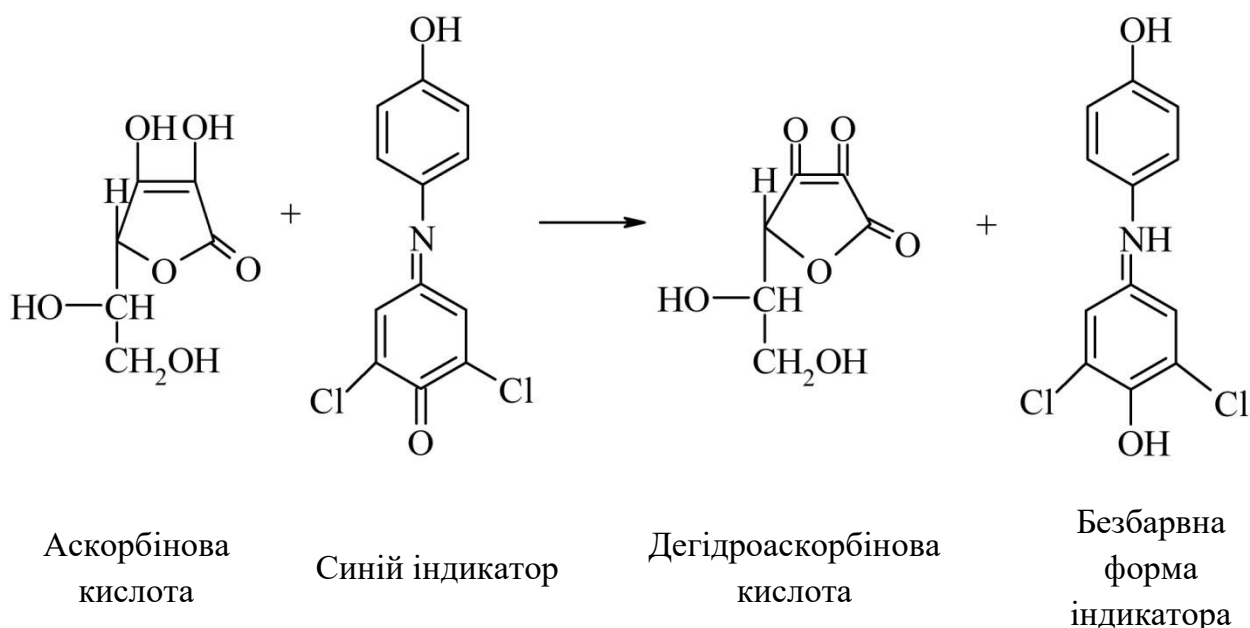
Аскорбінова кислота відноситься до водорозчинних вітамінів і синтезується в більшості тварин з глюкози або галактози. В організмі людини, приматів, морської свинки, деяких птахів і риб аскорбінова кислота не синтезується і є для них вітаміном (вітамін С). Вітамін С існує в двох формах, які є активні і можуть переходити одна в одну:



Аскорбінова кислота

Дегідроаскорбінова
кислота

Метод визначення вітаміну С базується на його здатності відновлювати індикатор 2,6-дихлорфеноліндофенол, який при цьому втрачає синій колір (в кислому середовищі він рожевий) і знебарвлюється:



Очевидно, що цей метод забезпечує визначення лише відновленої форми вітаміну С – власне аскорбінової кислоти. Для визначення одночасно обох форм вітаміну С необхідно протягом декількох хвилин пропускати через взірець молока сірководень.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, насичений розчин щавлевої кислоти (в конічну колбу вносять 10 г щавлевої кислоти і 100 см³ дистильованої води, перемішують, витримують 1-2 год і фільтрують через паперовий фільтр), насичений розчин хлориду натрію (в конічну колбу вносять 26,43 г хлориду натрію і 100 см³ дистильованої води, перемішують, витримують 2-3 год і фільтрують через паперовий фільтр), розчин 0,001 моль/дм³ 2,6-дихлорфеноліндофенолу (в мірну колбу місткістю 500 см³ вносять 133,50 мг 2,6-дихлорфеноліндофенолу, додають 200 см³ дистильованої води і 10 крапель розчину 0,01 моль/дм³ гідроксиду натрію, перемішують, розчиняють, доводять до позначки дистильованою водою, фільтрують у посуд з темного скла та закривають притертим корком), конічні

колби ємністю 100 і 250 см³, ваги лабораторні 2-го класу точності, піпетки (5, 10 і 25 см³), лійка, бюретка ємністю 5 см³.

Хід визначення

У конічну колбу зважують 50,0 г досліджуваного молока і вносять піпетками 4 см³ насиченого розчину щавлевої кислоти і 10 см³ насиченого розчину хлориду натрію. Після цього вміст колби перемішують, витримують 5 хв і фільтрують в конічну колбу місткістю 100 см³.

В конічну колбу (100 см³) вносять 25 см³ фільтрату і титрують з бюретки розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,001 моль/дм³) до появи рожевого забарвлення, що спричинено надлишком індикатора.

Вміст аскорбінової кислоти в молоці обчислюють за формулою:

$$\omega_C = \frac{V \cdot T \cdot 0,088}{m} 1000 \text{ (мг/кг)},$$

де ω_C – масова частка аскорбінової кислоти, мг/кг;

V – об'єм розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого на титрування, см³;

T – поправковий коефіцієнт до титру індикатора;

0,088 – маса аскорбінової кислоти, яка відповідає 1 см³ 2,6-дихлорфеноліндофенолу, мг;

m – маса молока, що відповідає взятому фільтрату, г ($m = 19,5$ г);

1000 – коефіцієнт перерахунку на кілограм молока.

Після підстановки відомих значень формула набуде наступного вигляду:

$$\omega_C = 4,51 \cdot V \cdot T \text{ (мг/кг)}.$$

Запитання для самоконтролю

1. Які макро- і мікроелементи входять до складу молока?
2. Чим відрізняється склад макро- і мікроелементів молока корови і людини?
3. Які функції макро- і мікроелементи молока відіграють в організмі?
4. Охарактеризуйте вплив солей молока на його властивості.
5. Як впливають макро- і мікроелементи на біохімічні процеси в молоці?
6. Якими методами визначають мінеральні сполуки молока?
7. На чому базується комплексонометричний метод визначення масової частки кальцію в молоці?
8. Охарактеризуйте метод визначення масової частки хлоридів у молоці.
9. Які вітаміни входять до складу молока? Чим відрізняється склад вітамінів молока корови і людини?
10. Які функції виконують вітаміни молока в організмі?
11. Яким методом визначають в молоці масову частку вітаміну С?

Лабораторна робота № 8

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОЛОКА

Молоко складається з декількох дисперсних систем. Дисперсні системи – це гетерогенні системи, що складаються з двох і більше фаз, одна з яких має високо розвинену поверхню. Фаза з розвиненою поверхнею – дисперсна фаза, а неперервна фаза, в якій вона розміщена, називається дисперсійним середовищем. Дисперсні системи характеризуються ступенем подрібнення дисперсної фази і вимірюються діаметром її частинок (табл. 16).

Таблиця 16 – Класифікація дисперсних систем за розміром частинок

Назва дисперсної системи	Розміри частинок	
	м	нм
Грубодисперсна	>0,00001	>10000
Мікрогетерогенна	0,00001-0,0000001	10000-100
Ультрамікрогетерогенна (колоїдна)	0,0000001-0,000000001	100-1
Істинний розчин	<0,000000001	<1

За агрегатним станом дисперсної фази у дисперсійному середовищі Оствальд поділив дисперсні системи наступним чином (табл. 17).

Таблиця 17 – Класифікація дисперсних систем за агрегатним станом дисперсної фази

Дисперсна система	Дисперсна фаза	Дисперсійне середовище
Піна, газова емульсія	Газ	Рідина
Емульсія	Рідина	Рідина
Колоїдні розчини, суспензії	Тверді частинки	Рідина

За ступенем однорідності розрізняють монодисперсні і полідисперсні системи. Якщо частинки просторово віддалені між собою – система інкогерентно дисперсна.

Враховуюче сказане, А. Тьопел дав наступне визначення молока з точки зору фізикоїдної хімії: «Молоко є інкогерентна, корпускулярна полідисперсна система, в якій жир емульгований, а білки присутні у колоїдному стані в гомогенному розчині решти складових частин молока». Отже, молоко складається з декількох взаємозв'язаних між собою дисперсних систем. Це наступні системи:

1. Емульсія жирових кульок (500-5000 нм) у молочній плазмі. Під плазмою розуміють молоко звільнене від жиру. Свіже молоко – це двофазна емульсія, оскільки жир у жирових кульках перебуває у рідкому стані. При низьких температурах частина жиру кристалізується і утворюється багатофазна емульсія.
2. Колоїдний розчин (ультрамікрогетерогенна суспензія) білків молока і колоїдного фосфату кальцію у молочній сироватці. Під молочною сироваткою розуміють водний розчин молекулярно- та іонно-дисперсних складових частин молока.
3. Істинний розчин – це водний розчин лактози, моносахаридів, вітамінів, низькомолекулярних солей, кислот, CO_2 .

Фізико-хімічні властивості молока зумовлені складом різних його фаз і їх взаємодією. Ці властивості молока характеризують фізико-хімічними показниками. До них можна віднести температуру, густину, кислотність, в'язкість, окислювально-відновний потенціал, температуру замерзання та ін. З допомогою фізико-хімічних показників можна характеризувати якість молока, здійснювати контроль за перебігом технологічних процесів. Для визначення цих показників використовують хімічні і фізико-хімічні методи. В більшості випадків фізико-хімічні методи мають ряд переваг перед чисто хімічними. Вони легше піддаються автоматизації і потребують менше затрат часу та агресивних і токсичних реагентів.

8.1. Визначення температури молока (на основі ДСТУ 6066:2008)

Дослідження молока, а також технологічні операції з молоком проводять при певних температурах. Значення температури суттєво впливають на інші фізико-хімічні показники молока та перебіг біохімічних і мікробіологічних процесів у молоці. Тому правильне визначення його температури є важливим завданням при роботі з молоком.

Температуру молока можна визначити скляним рідинним термометром (без застосування ртуті) або цифровим термометром ТС-101 (рис. 28).



Рисунок 28 – Цифровий термометр TP-101

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, етиловий спирт ректифікований, склянки місткістю 500 см³, скляна паличка, годинник, термометри скляні рідинні (нертутні) з діапазоном вимірювання 0-50 °C і 0-100 °C та ціною поділки 0,5-1 °C, термометр цифровий

ТС-101 з термозондами № 1 (діапазон вимірювання від 1 до 99 °С) і № 2 (діапазон вимірювання від 1 до 15 °С).

Хід роботи

Молоко з невідомою температурою перемішують в склянці. Скляний термометр занурюють в молоко до нижньої цифрової позначки і витримують в ньому не менше 2 хв. Показання зчитують, не витягуючи термометр з молока. Отримане значення температури заокруглюють до цілого значення.

При вимірюванні температури молока цифровим термометром ТС-101 його кожен раз необхідно протерти марлею, змоченою етиловим спиртом. Після цього перемикач роботи режимів індикації переводять у положення, що відповідає автоматичному режиму роботи. Якщо на табло замість цифр висвічуються коми, то необхідно замінити елементи живлення. Далі термозонд занурюють у молоко на глибину 10-15 см, включають термометр і витримують (20-25 с) до висвічування результату вимірювання на табло. Під час вимірювання молоко обережно перемішують термозондом. Температуру за показами табло вимірювального блоку визначають з точністю до 0,1 °С.

8.2. Визначення густини молока (на основі ДСТУ 6082:2009)

Густина визначається як маса на одиницю об'єму. У системі СІ за одиницю густини прийнято $\text{кг}/\text{м}^3$. Густина молока – це відношення маси молока певного об'єму при 20 °С до маси води такого ж об'єму при 4 °С (вода має густину $1000 \text{ кг}/\text{м}^3$ при 4 °С). Густина молока знаходиться в межах $1027\text{-}1032 \text{ кг}/\text{м}^3$. Густина різних компонентів молока показана в табл. 18. Збільшення вмісту води і жиру призводить до зменшення густини молока. Зокрема, додавання 10 % води призводить до зменшення густини на $3 \text{ кг}/\text{м}^3$. Встановити фальсифікацію можна, коли додають 15 % води і більше. Збільшення вмісту білків, вуглеводів і мінеральних речовин призводить до збільшення густини.

Густина знежиреного молока становить 1033-1038 кг/м³, а молозива – 1040 кг/м³ (за рахунок високої концентрації білків).

При підвищенні температури густина молока зменшується за рахунок збільшення об'єму і навпаки. Якщо вимірювання ведеться при температурах, що відрізняються від 20 °С (± 5 °С), то вводять поправку за таблицями. За відсутності таблиць до значення густини, визначеної при температурі вище 20 °С додають (а при нижчій температурі – віднімають) 0,2 від значення густини на кожен градус. Густину молока можна виражати у градусах ареометра. Градуси ареометра – це дві останні цифри цілої частини значення густини. Наприклад, густина 1031 кг/м³ відповідає 31 °А.

Таблиця 19 – Густина різних компонентів молока (кг/м³)

Компоненти	Межі коливання	Середнє значення
Жир	918-927	923
Лактоза	1592-1628	1610
Білки	1333-1448	1391
Мінеральні речовини	2617-3098	2857
Сухий залишок	1296-1450	1373
Сухий знежирений залишок	1598-1623	1610

Показники густини використовують для встановлення фальсифікацій молока, визначення ступеня згущення сироватки, а також розрахунку вмісту сухих речовин. Між густиною, вмістом жиру і сухого знежиреного залишку існує пряма залежність. Це дозволяє досить точно і швидко визначити вміст сухих речовин у молоці.

Густину молока вимірюють пікнометричним і ареометричним методами. Найбільш поширеним є ареометричний метод.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко; знежирене молоко; ареометри для молока АМ з ціною поділки шкали 1,0 кг/м³ або АТМ з ціною поділки шкали 1,0 кг/м³; ареометри загального призначення АОН-1 або АОН-2 з ціною поділки 1,0 кг/м³; циліндри скляні для ареометрів із зовнішнім діаметром 31, 39, 50 мм і висотою 215, 265 і 415 мм відповідно; термометри ртутні скляні лабораторні з діапазоном вимірювань 0-55 °С і ціною поділки 0,5 і 1,0 °С; термометри скляні рідинні (нертутні) з діапазоном вимірювань 0-30 °С і ціною поділки 0,5 і 1,0 °С; секундомір; водяна баня.

Хід визначення

Густину молока визначають при температурах від 15 до 25 °С не раніше, ніж через 2 год після доїння. Якщо у зразку відстоялися вершки, то його необхідно прогріти до 35 °С, перемішати і знову охолодити до 20°С.

Досліджуване молоко (250 см³) перемішують і обережно без утворення піни переливають у сухий циліндр. Циліндр встановлюють на рівній горизонтальній поверхні і вимірюють температуру молока (t_1) через 2-4 хв після занурення термометра в молоко. Далі в молоко повільно опускають ареометр і залишають його у вільно плаваючому стані так, щоб він не торкався стінок циліндра. Перше зчитування показів густини (ρ_1) роблять через 3 хв після припинення коливання ареометра. Після цього ареометр піднімають і опускають в молоко, роблять друге зчитування показників густини (ρ_2) з нерухомого ареометра. При зчитуванні результатів око повинно знаходитися на рівні меніска. Покази зчитують по верхньому краю меніска. Зчитування показів з ареометрів АМ і АТМ проводять до половини ціни найменшої поділки шкали, а в ареометрах АОН-1 і АОН-2 – до ціни найменшої поділки. Далі знову вимірюють температуру (t_2) досліджуваного молока. Для вимірювання температури можна використовувати термометри обох типів (ртутних і

нертутних). Розходження між повторними визначеннями густини не повинно перевищувати $0,5 \text{ кг/м}^3$ для ареометрів АМ і АМТ та $1,0 \text{ кг/м}^3$ – для ареометрів АОН-1 і АОН-2.

При обчисленні густини використовують середньоарифметичне значення температури за результатами двох вимірювань t_1 і t_2 . Якщо дробова частина середньоарифметичного значення температури дорівнює або менша $0,25 \text{ }^\circ\text{C}$, то її не враховують; якщо дорівнює або більша, ніж $0,75 \text{ }^\circ\text{C}$, то її заокруглюють до одиниці; якщо вона більша за $0,25 \text{ }^\circ\text{C}$, але менша, ніж $0,75 \text{ }^\circ\text{C}$, то її заокруглюють до $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Значення густини досліджуваного молока обчислюють як середньоарифметичне за результатами двох вимірювань ρ_1 і ρ_2 . При цьому використовують такі ж правила заокруглення, як при визначенні середньої температури.

Якщо молоко під час визначення густини мало температуру вищу або нижчу ніж $20 \text{ }^\circ\text{C}$, то отримані при температурі результати, необхідно привести до $20 \text{ }^\circ\text{C}$ з використанням табл. 19 (для молока) або табл. 20 (для знежиреного молока). При цьому у лівій крайній колонці знаходять ідентичне до визначеного значення $\rho_{\text{сер}}^t$, а у верхньому рядку – температури, при якій проводили вимірювання. На перетині цих колонки і рядка буде значення густини, приведене до $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Таблиця 19 – Таблиця зведення густини коров'ячого молока до $20 \text{ }^\circ\text{C}$

Густина молока $\rho_{\text{сер}}^t$, кг/м^3	Густина, зведена до 20°C , кг/м^3 , при температурі молока t , $^\circ\text{C}$										
	15,0	15,5	16,0	16,5	17,0	17,5	18,0	18,5	19,0	19,5	20,0
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	11
1025,0	1023,4	1023,6	1023,7	1023,9	1024,0	1024,2	1024,4	1024,5	1024,7	1024,8	1025,0
1025,5	1023,9	1024,1	1024,2	1024,4	1024,5	1024,7	1024,9	1025,0	1025,2	1025,3	1025,5
1026,0	1024,4	1024,6	1024,7	1024,9	1025,0	1025,2	1025,4	1025,5	1025,7	1025,8	1026,0
1026,5	1024,9	1025,1	1025,2	1025,4	1025,5	1025,7	1025,9	1026,0	1026,2	1026,3	1026,5
1027,0	1025,4	1025,6	1025,7	1025,9	1026,0	1026,2	1026,4	1026,5	1026,7	1026,8	1027,0
1027,5	1025,9	1026,1	1026,2	1026,4	1026,5	1026,7	1026,9	1027,0	1027,2	1027,3	1027,5

Продовження таблиці 19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1028,0	1026,4	1026,6	1026,7	1026,9	1027,0	1027,2	1027,4	1027,5	1027,7	1027,8	1028,0
1028,5	1026,9	1027,1	1027,2	1027,4	1027,5	1027,7	1027,9	1028,0	1028,2	1028,3	1028,5
1029,0	1027,4	1027,6	1027,7	1027,9	1028,0	1028,2	1028,4	1028,5	1028,7	1028,8	1029,0
1029,5	1027,9	1028,1	1028,2	1028,4	1028,5	1028,7	1028,9	1029,0	1029,2	1029,3	1029,5
1030,0	1028,4	1028,6	1028,7	1028,9	1029,0	1029,2	1029,4	1029,5	1029,7	1029,8	1030,0
1030,5	1028,9	1029,1	1029,2	1029,4	1029,5	1029,7	1029,9	1030,0	1030,2	1030,3	1030,5
1031,0	1029,4	1029,6	1029,7	1029,9	1030,0	1030,2	1030,4	1030,5	1030,7	1030,8	1031,0
1031,5	1029,9	1030,1	1030,2	1030,4	1030,5	1030,7	1030,9	1031,0	1031,2	1031,3	1031,5
1032,0	1030,4	1030,6	1030,7	1030,9	1031,0	1031,2	1031,4	1031,5	1031,7	1031,8	1032,0
1032,5	1030,9	1031,1	1031,2	1031,4	1031,5	1031,7	1031,9	1032,0	1032,2	1032,3	1032,5
1033,0	1031,4	1031,6	1031,7	1031,9	1032,0	1032,2	1032,4	1032,5	1032,7	1032,8	1033,0
1033,5	1031,9	1032,1	1032,2	1032,4	1032,5	1032,7	1032,9	1033,0	1033,2	1033,3	1033,5
1034,0	1032,4	1032,6	1032,7	1032,9	1033,0	1033,2	1033,4	1033,5	1033,7	1033,8	1034,0
1034,5	1032,9	1033,1	1033,2	1033,4	1033,5	1033,7	1033,9	1034,0	1034,2	1034,3	1034,5
1035,0	1033,4	1033,6	1033,7	1033,9	1034,0	1034,2	1034,4	1034,5	1034,7	1034,8	1035,0
1035,5	1033,9	1034,1	1034,2	1034,4	1034,5	1034,7	1034,9	1035,0	1035,2	1035,3	1035,5
1036,0	1034,4	1034,6	1034,7	1034,9	1035,0	1035,2	1035,4	1035,5	1035,7	1035,8	1036,0

Продовження таблиці 19

Густина молока $\rho_{\text{сер}}^t$, кг/м ³	Густина, зведена до 20°C, кг/м ³ , при температурі молока t, °C									
	20,5	21,0	21,5	22,0	22,5	23,0	23,5	24,0	24,5	25,0
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1025,0	1025,2	1025,3	1025,5	1025,6	1025,8	1026,0	1026,1	1026,3	1026,4	1026,6
1025,5	1025,7	1025,8	1026,0	1026,1	1026,3	1026,5	1026,6	1026,8	1026,9	1027,1
1026,0	1026,2	1026,3	1026,5	1026,6	1026,8	1027,0	1027,1	1027,3	1027,4	1027,6
1026,5	1026,7	1026,8	1027,0	1027,1	1027,3	1027,5	1027,6	1027,8	1027,9	1028,1
1027,0	1027,2	1027,3	1027,5	1027,6	1027,8	1028,0	1028,1	1028,3	1028,4	1028,6
1027,5	1027,7	1027,8	1028,0	1028,1	1028,3	1028,5	1028,6	1028,8	1028,9	1029,1
1028,0	1028,2	1028,3	1028,5	1028,6	1028,8	1029,0	1029,1	1029,3	1029,4	1029,6
1028,5	1028,7	1028,8	1029,0	1029,1	1029,3	1029,5	1029,6	1029,8	1029,9	1030,1
1029,0	1029,2	1029,3	1029,5	1029,6	1029,8	1030,0	1030,1	1030,3	1030,4	1030,6
1029,5	1029,7	1029,8	1030,0	1030,1	1030,3	1030,5	1030,6	1030,8	1030,9	1031,1

Закінчення таблиці 19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1030,0	1030,2	1030,3	1030,5	1030,6	1030,8	1031,0	1031,1	1031,3	1031,4	1031,6
1030,5	1030,7	1030,8	1031,0	1031,1	1031,3	1031,5	1031,6	1031,8	1031,9	1032,1
1031,0	1031,2	1031,3	1031,5	1031,6	1031,8	1032,0	1032,1	1032,3	1032,4	1032,6
1031,5	1031,7	1031,8	1032,0	1032,1	1032,3	1032,5	1032,6	1032,8	1032,9	1033,1
1032,0	1032,2	1032,3	1032,5	1032,6	1032,8	1033,0	1033,1	1033,3	1033,4	1033,6
1032,5	1032,7	1032,8	1033,0	1033,1	1033,3	1033,5	1033,6	1033,8	1033,9	1034,1
1033,0	1033,2	1033,3	1033,5	1033,6	1033,8	1034,0	1034,1	1034,3	1034,4	1034,6
1033,5	1033,7	1033,8	1034,0	1034,1	1034,3	1034,5	1034,6	1034,8	1034,9	1035,1
1034,0	1034,2	1034,3	1034,5	1034,6	1034,8	1035,0	1035,1	1035,3	1035,4	1035,6
1034,5	1034,7	1034,8	1035,0	1035,1	1035,3	1035,5	1035,6	1035,8	1035,9	1036,1
1035,0	1035,2	1035,3	1035,5	1035,6	1035,8	1036,0	1036,1	1036,3	1036,4	1036,6
1035,5	1035,7	1035,8	1036,0	1036,1	1036,3	1036,5	1036,6	1036,8	1036,9	1037,1
1036,0	1036,2	1036,3	1036,5	1036,6	1036,8	1037,0	1037,1	1037,3	1037,4	1037,6

Таблиця 20 – Таблиця зведення густини знежиреного молока до 20°C

Густина молока $\rho^{t_{сер}}$, кг/м ³	Густина, зведена до 20°C, кг/м ³ , при температурі молока t, °C										
	15,0	15,5	16,0	16,5	17,0	17,5	18,0	18,5	19,0	19,5	20,0
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1028,0	1026,7	1026,8	1027,0	1027,1	1027,2	1027,4	1027,5	1027,6	1027,7	1027,9	1028,0
1028,5	1027,2	1027,3	1027,5	1027,6	1027,7	1027,9	1028,0	1028,1	1028,2	1028,4	1028,5
1029,0	1027,7	1027,8	1028,0	1028,1	1028,2	1028,4	1028,5	1028,6	1028,7	1028,9	1029,0
1029,5	1028,2	1028,3	1028,5	1028,6	1028,7	1028,9	1029,0	1029,1	1029,2	1029,4	1029,5
1030,0	1028,7	1028,8	1029,0	1029,1	1029,2	1029,4	1029,5	1029,6	1029,7	1029,9	1030,0
1030,5	1029,2	1029,3	1029,5	1029,6	1029,7	1029,9	1030,0	1030,1	1030,2	1030,4	1030,5
1031,0	1029,7	1029,8	1030,0	1030,1	1030,2	1030,4	1030,5	1030,6	1030,7	1030,9	1031,0
1031,5	1030,2	1030,3	1030,5	1030,6	1030,7	1030,9	1031,0	1031,1	1031,2	1031,4	1031,5
1032,0	1030,7	1030,8	1031,0	1031,1	1031,2	1031,4	1031,5	1031,6	1031,7	1031,9	1032,0
1032,5	1031,2	1031,3	1031,5	1031,6	1031,7	1031,9	1032,0	1032,1	1032,2	1032,4	1032,5
1033,0	1031,7	1031,8	1032,0	1032,1	1032,2	1032,4	1032,5	1032,6	1032,7	1032,9	1033,0
1033,5	1032,2	1032,3	1032,5	1032,6	1032,7	1032,9	1033,0	1033,1	1033,2	1033,4	1033,5
1034,0	1032,7	1032,8	1033,0	1033,1	1033,2	1033,4	1033,5	1033,6	1033,7	1033,9	1034,0
1034,5	1033,2	1033,3	1033,5	1033,6	1033,7	1033,9	1034,0	1034,1	1034,2	1034,4	1034,5

Продовження таблиці 20

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1035,0	1033,7	1033,8	1034,0	1034,1	1034,2	1034,4	1034,5	1034,6	1034,7	1034,9	1035,0
1035,5	1034,2	1034,3	1034,5	1034,6	1034,7	1034,9	1035,0	1035,1	1035,2	1035,4	1035,5
1036,0	1034,7	1034,8	1035,0	1035,1	1035,2	1035,4	1035,5	1035,6	1035,7	1035,9	1036,0
1036,5	1035,2	1035,3	1035,5	1035,6	1035,7	1035,9	1036,0	1036,1	1036,2	1036,4	1036,5
1037,0	1035,7	1035,8	1036,0	1036,1	1036,2	1036,4	1036,5	1036,6	1036,7	1036,9	1037,0
1037,5	1036,2	1036,3	1036,5	1036,6	1036,7	1036,9	1037,0	1037,1	1037,2	1037,4	1037,5
1038,0	1036,7	1036,8	1037,0	1037,1	1037,2	1037,4	1037,5	1037,6	1037,7	1037,9	1038,0

Продовження таблиці 20

Густина молока $\rho_{\text{сер,}}^t$ кг/м ³	Густина, зведена до 20 °С, кг/м ³ , при температурі молока t, °С									
	20,5	21,0	21,5	22,0	22,5	23,0	23,5	24,0	24,5	25,0
1028,0	1028,1	1028,3	1028,4	1028,5	1028,7	1028,8	1028,9	1029,0	1029,2	1029,3
1028,5	1028,6	1028,8	1028,9	1029,0	1029,2	1029,3	1029,4	1029,5	1029,7	1029,8
1029,0	1029,1	1029,3	1029,4	1029,5	1029,7	1029,8	1029,9	1030,0	1030,2	1030,3
1029,5	1029,6	1029,8	1029,9	1030,0	1030,2	1030,3	1030,4	1030,5	1030,7	1030,8
1030,0	1030,1	1030,3	1030,4	1030,5	1030,7	1030,8	1030,9	1031,0	1031,2	1031,3
1030,5	1030,6	1030,8	1030,9	1031,0	1031,2	1031,3	1031,4	1031,5	1031,7	1031,8
1031,0	1031,1	1031,3	1031,4	1031,5	1031,7	1031,8	1031,9	1032,0	1032,2	1032,3
1031,5	1031,6	1031,8	1031,9	1032,0	1032,2	1032,3	1032,4	1032,5	1032,7	1032,8
1032,0	1032,1	1032,3	1032,4	1032,5	1032,7	1032,8	1032,9	1033,0	1033,2	1033,3
1032,5	1032,6	1032,8	1032,9	1033,0	1033,2	1033,3	1033,4	1033,5	1033,7	1033,8
1033,0	1033,1	1033,3	1033,4	1033,5	1033,7	1033,8	1033,9	1034,0	1034,2	1034,3
1033,5	1033,6	1033,8	1033,9	1034,0	1034,2	1034,3	1034,4	1034,5	1034,7	1034,8
1034,0	1034,1	1034,3	1034,4	1034,5	1034,7	1034,8	1034,9	1035,0	1035,2	1035,3
1034,5	1034,6	1034,8	1034,9	1035,0	1035,2	1035,3	1035,4	1035,5	1035,7	1035,8
1035,0	1035,1	1035,3	1035,4	1035,5	1035,7	1035,8	1035,9	1036,0	1036,2	1036,3
1035,5	1035,6	1035,8	1035,9	1036,0	1036,2	1036,3	1036,4	1036,5	1036,7	1036,8
1036,0	1036,1	1036,3	1036,4	1036,5	1036,7	1036,8	1036,9	1037,0	1037,2	1037,3
1036,5	1036,6	1036,8	1036,9	1037,0	1037,2	1037,3	1037,4	1037,5	1037,7	1037,8
1037,0	1037,1	1037,3	1037,4	1037,5	1037,7	1037,8	1037,9	1038,0	1038,2	1038,3
1037,5	1037,6	1037,8	1037,9	1038,0	1038,2	1038,3	1038,4	1038,5	1038,7	1038,8
1038,0	1038,1	1038,3	1038,4	1038,5	1038,7	1038,8	1038,9	1039,0	1039,2	1039,3

Приклад. Температура молока $t = 19,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, густина $\rho_{\text{сер}}^t = 1025,0\text{ кг/м}^3$. За табл. 19 значенню густини $\rho_{\text{сер}}^t = 1025,0\text{ кг/м}^3$ при температурі $t = 19,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ відповідає приведене до $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ значення густини $1024,7\text{ кг/м}^3$.

Якщо молоко (молоко знежирене) має температуру від 10 до $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, то до значення його густини $\rho_{\text{сер}}^t$ додають поправку, знайдену в табл. 21 (для молока) і табл. 22 (для знежиреного молока).

Таблиця 21 – Таблиця поправок для визначення фактичної густини коров'ячого молока в діапазоні температур $10\text{-}15\text{ }^{\circ}\text{C}$

Температура молока t при вимірюванні густини, $^{\circ}\text{C}$	Значення величини поправки, кг/м^3 , при температурі молока, $^{\circ}\text{C}$									
	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0	13,5	14,0	14,5
15,0	1,6	1,4	1,3	1,1	1,0	0,8	0,6	0,5	0,3	0,2
15,5	1,8	1,6	1,4	1,3	1,1	1,0	0,8	0,6	0,5	0,3
16,0	1,9	1,8	1,6	1,4	1,3	1,1	1,0	0,8	0,6	0,5
16,5	2,1	1,9	1,8	1,6	1,4	1,3	1,1	1,0	0,8	0,6
17,0	2,2	2,1	1,9	1,8	1,6	1,4	1,3	1,1	1,0	0,8
17,5	2,4	2,2	2,1	1,9	1,8	1,6	1,4	1,3	1,1	1,0
18,0	2,6	2,4	2,2	2,1	1,9	1,8	1,6	1,4	1,3	1,1
18,5	2,7	2,6	2,4	2,2	2,1	1,9	1,8	1,6	1,4	1,3
19,0	2,9	2,7	2,6	2,4	2,2	2,1	1,9	1,8	1,6	1,4
19,5	3,0	2,9	2,7	2,6	2,4	2,2	2,1	1,9	1,8	1,6
20,0	3,2	3,0	2,9	2,7	2,6	2,4	2,2	2,1	1,9	1,8
20,5	3,4	3,2	3,0	2,9	2,7	2,6	2,4	2,2	2,1	1,9
21,0	3,5	3,4	3,2	3,0	2,9	2,7	2,6	2,4	2,2	2,1
21,5	3,7	3,5	3,4	3,2	3,0	2,9	2,7	2,6	2,4	2,2
22,0	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2	3,0	2,9	2,7	2,6	2,4
22,5	4,0	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2	3,0	2,9	2,7	2,6
23,0	4,2	4,0	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2	3,0	2,9	2,7

Продовження таблиці 21

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
23,5	4,3	4,2	4,0	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2	3,0	2,9
24,0	4,5	4,3	4,2	4,0	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2	3,0
24,5	4,6	4,5	4,3	4,2	4,0	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2
25,0	4,8	4,6	4,5	4,3	4,2	4,0	3,8	3,7	3,5	3,4

Таблиця 22 – Таблиця поправок для визначення фактичної густини знежиреного молока в діапазоні температур 10-15 °С

Температура молока t при вимірюванні густини, °С	Значення величини поправки, кг/м ³ , при температурі молока, °С									
	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0	13,5	14,0	14,5
15,0	1,3	1,2	1,1	1,0	0,8	0,7	0,6	0,4	0,3	0,1
15,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,8	0,7	0,6	0,4	0,3
16,0	1,6	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,8	0,7	0,6	0,4
16,5	1,7	1,6	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,8	0,7	0,6
17,0	1,8	1,7	1,6	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,8	0,7
17,5	2,0	1,8	1,7	1,6	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,8
18,0	2,1	2,0	1,8	1,7	1,6	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0
18,5	2,2	2,1	2,0	1,8	1,7	1,6	1,4	1,3	1,2	1,1
19,0	2,3	2,2	2,1	2,0	1,8	1,7	1,6	1,4	1,3	1,2
19,5	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0	1,8	1,7	1,6	1,4	1,3
20,0	2,6	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0	1,8	1,7	1,6	1,4
20,5	2,7	2,6	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0	1,8	1,7	1,6
21,0	2,9	2,7	2,6	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0	1,8	1,7
21,5	3,0	2,9	2,7	2,6	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0	1,8
22,0	3,1	3,0	2,9	2,7	2,6	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0
22,5	3,3	3,1	3,0	2,9	2,7	2,6	2,5	2,3	2,2	2,1
23,0	3,4	3,3	3,1	3,0	2,9	2,7	2,6	2,5	2,3	2,2
23,5	3,5	3,4	3,3	3,1	3,0	2,9	2,7	2,6	2,5	2,3
24,0	3,6	3,5	3,4	3,3	3,1	3,0	2,9	2,7	2,6	2,5
24,5	3,8	3,6	3,5	3,4	3,3	3,1	3,0	2,9	2,7	2,6
25,0	3,9	3,8	3,6	3,5	3,4	3,3	3,1	3,0	2,9	2,7

Приклад. Температура молока 12,5 °С. Густина цього молока $\rho_{\text{сер}}^t = 1029,5 \text{ кг/м}^3$ при температурі 16,0 °С. В таблиці поправок (табл. 21) знаходять в крайній лівій колонці рядок із значенням температури 16,0 °С. На перетині цього рядка і колонки для температури 12,5 °С знаходять значення величини поправки густини – 1,1 кг/м³. Фактична густина при температурі 12,5 °С буде дорівнювати $1029,5 \text{ кг/м}^3 + 1,1 \text{ кг/м}^3 = 1030,6 \text{ кг/м}^3$.

8.3. Визначення кислотності молока

Термін «кислотність», очевидно, пов'язаний з тим, що значення рН молока і більшості молочних продуктів знаходяться в кислій області. Кислотність – це дуже важливий показник, який характеризує біохімічні процеси, що призводять до утворення молочної кислоти. Кислотність молока прийнято характеризувати двома показниками:

1. Титрована (потенційна) кислотність.
2. Активна кислотність.

Титрована кислотність характеризує вміст всіх кислотних сполук молока. Активна кислотність характеризує фактичну концентрацію іонів водню. Є різні способи вираження титрованої кислотності. В Україні її виражають у градусах Тернера (°Т). Градуси Тернера – це об'єм (см³) гідроксиду натрію (0,1 моль/дм³), який пішов на нейтралізацію кислотних сполук у 100 см³ молока. Як індикатор при титруванні використовують фенолфталеїн (5 % спиртовий розчин; перехід у забарвлену форму при рН 8-9).

Кислотність свіжого молока становить 16-18 °Т. Вклад білків у це значення становить 4-5 °Т, кислих солей – 11 °Т, СО₂ та інших сполук – 1-8 °Т. Вміст молочної кислоти 0,009 % відповідає 1 °Т. Титрована кислотність молока залежить від багатьох факторів (харчування, порода, вік, захворювання корів). Так, до підвищення кислотності призводить нестача кальцію в раціоні, надлишок силосу, жому і барди (до 26 °Т). Зменшується кислотність при захворюванні маститом (до 6 °Т) і туберкульозом (до 7 °Т).

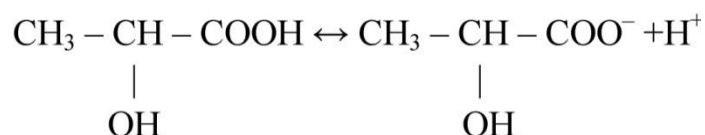
Активна кислотність зумовлена іонами водню, які утворюються при дисоціації кислот і кислих солей молока. Концентрація іонів водню в біологічних об'єктах, в тому числі в молоці, є низькою і її позначають в одиницях рН:

$$\text{pH} = -\lg[\text{H}^+].$$

Молоко в середньому має рН=6,7 (6,6-6,8).

По мірі утворення молочної кислоти активна кислотність змінюється повільніше, ніж титрована. Це відбувається завдяки буферним властивостям молока. Молоко є складною буферною системою. Переважно молоко включає слабкі кислоти і їх середні та кислі солі (фосфати, цитрати, карбонати). Дві кислі солі фосфорної кислоти – NaH_2PO_4 (дигідрофосфат натрію) і Na_2HPO_4 (динатрій гідрофосфат) одночасно виконують функцію слабкої кислоти і її лужної солі. Типову буферну систему в молоці утворює дисоційована і недисоційована слабка молочна кислота, яка появляється в процесі молочнокислого бродіння. Певний вклад в буферні властивості вносять білки молока, які мають карбоксильні, сульфгідрильні та аміногрупи.

Буферні властивості молочної кислоти проявляються наступним чином. Як слабка кислота, вона дисоціює в незначній мірі:



Додавання кислоти призводить до збільшення активності іонів водню і порушує рівновагу дисоціації. Для підтримки константи дисоціації додані іони водню зв'язуються з іонами лактату, утворюючи недисоційовану молочну кислоту. Таким чином, частина іонів водню зв'язується і не проявляє кислотні властивості.

Буферні властивості вимірюються буферною ємністю. Буферна ємність – це кількість еквівалентів кислоти або лугу, яка необхідна для того, щоб змінити величину рН в 1 л розчину на 1 одиницю рН. Буферна ємність досягає максимальної величини, коли концентрація кислого компоненту системи

дорівнює концентрації її лужної солі. У випадку слабкої кислоти – це значення рН (або рК), при якому кислота дисоційована наполовину. Для молочної кислоти це значення – 3,86. Буферна ємність проявляється в діапазоні ± 1 одиниця рН від рК. Для молочної кислоти цей діапазон рН становить від 2,86 до 4,86. Оскільки рК буферних пар молока (окрім $\text{HCO}_3^{-1}/\text{CO}_3^{-2}$ – рК = 10) знаходиться нижче 7, то буферна ємність молока найвища в кислому діапазоні рН (рН від 5 до 6).

В такій складній системі, як молоко і молочні продукти, розрахувати рН неможливо. Тому його вимірюють за допомогою рН-метрів. Показник рН має велике значення в контролі технологічних процесів, а також при визначенні якості молока. Одиниці рН неможливо точно перерахувати в градуси Тернера. Тому кислотність молока і молочних продуктів одночасно характеризують і титрованою, і активною кислотністю.

8.3.1. Титрометричне визначення кислотності молока (на основі ГОСТ 3624-92)

В основі методу нейтралізація кислот молока розчином гідроксиду натрію або калію (0,1 моль/дм³) в присутності індикатора фенолфталеїну. Результат виражається в градусах Тернера (°Т).

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, гідроксид натрію концентрацією 0,1 моль/дм³ (можна використати готовий стандарт-титр), 1 % фенолфталеїн (в конічну колбу місткістю 200 см³ вносять 1,0 см³ фенолфталеїну і 70 см³ 95 % етанолу, розчиняють, додають 29 см³ дистильованої води і перемішують), сульфат кобальту (25 г/дм³), ваги 4-го класу точності, колби місткістю 250 см³, бюретки місткістю 25 см³, піпетки на 10 і 20 см³, склянки на 50 см³, термометр.

Хід визначення

Перед визначенням титрованої кислотності готують контрольний еталон забарвлення. Для цього в колбу (250 см³) додають 10 см³ молока, 20 см³ дистильованої води, 1 см³ розчину сульфату кобальту і ретельно перемішують. Термін зберігання еталону – до 8 год при кімнатній температурі.

Для визначення титрованої кислотності 10 см³ досліджуваного молока, 20 см³ дистильованої води і три краплі фенолфталеїну вносять в конічну колбу (250 см³). Суміш перемішують і титрують розчином гідроксиду натрію до появи слабо-рожевого забарвлення, яке відповідає контрольному еталону і не зникає протягом однієї хвилини.

Кислотність у градусах Тернера (°Т) визначають множенням об'єму (см³) розчину гідроксиду натрію, який був затрачений на нейтралізацію кислот, на 10. За кінцевий результат приймають середньоарифметичне значення двох паралельних визначень, які заокруглюють до другого десяткового знаку.

8.3.2. Визначення граничної кислотності молока (на основі ГОСТ 3624-92)

Визначення граничної кислотності використовують для проведення попереднього сортування молока при його масовому поступленні та при необхідності виконання великої кількості аналізів.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, гідроксид натрію концентрацією 0,1 моль/дм³, 1 % фенолфталеїн (готують як у попередній роботі), мірні колби місткістю 1000 см³, пробірки місткістю 20 см³, корки, піпетки на 5 і 10 см³, циліндри на 50 і 100 см³.

Хід визначення

Для визначення граничної кислотності готують свіжі робочі розчини гідроксиду натрію. Для цього в мірні колби (1000 см³) вносять необхідні об'єми

розчину гідроксиду натрію (0,1 моль/дм³) відповідно з вимогами таблиці 23. В кожну колбу відмірюють по 10 см³ фенолфталеїну і доводять до позначки дистильованою водою і перемішують. Отримані розчини використовують для визначення певної кислотності молока (табл. 23).

Таблиця 23 – Об'єм 0,1 моль/дм³ розчину гідроксиду натрію для приготування робочих розчинів

Об'єм розчину гідроксиду натрію (см ³)	80	85	90	95	100	105	110
Кислотність, °Т	16	17	18	19	20	21	22

Для визначення граничної кислотності в ряд пробірок вносять по 10 см³ робочих розчинів гідроксиду натрію для встановлення відповідного градуса кислотності. Далі в кожну пробірку наливають по 5 см³ досліджуваного молока. Пробірки закривають корками і вміст перемішують. Значення кислотності (°Т) відповідає першій пробірці, де забарвлення не зникає, починаючи від нижчої концентрації гідроксиду натрію.

8.3.3. Визначення активної кислотності молока (на основі ГОСТ 26781-85)

Метод вимірювання активної кислотності базується на визначенні активності іонів водню потенціометричними аналізаторами (рН-метрами або іономірами). Активну кислотність молока виражають в одиницях рН.

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, дистильована вода, стандарт-титри для приготування взірцевих буферних розчинів з рН 6,86 і 4,01, розчин хлориду калію (256 г хлориду калію вносять в мірну колбу на 1000 см³ і заливають кип'яченою дистильованою водою з температурою 50-60 °С до позначки, перемішуючи до повного розчинення, фільтрують і охолоджують), аналізатор потенціометричний (рН-121, ЭВ-74, рН-340), колби мірні (1000 см³), склянки (50 і 100 см³), ваги

лабораторні 4-го класу точності, циліндри (500 і 1000 см³), фільтрувальний папір, термометр.

Хід визначення

Перед визначенням необхідно перевірити прилад для потенціометрії (рис. 29) за вірцевими буферними розчинами. Для цього прилад (далі рН-метр) включають за 30 хв до вимірювання, промивають електроди дистильованою водою, залишки води видаляють фільтрувальним папером. В склянку наливають 40 см³ буферного розчину (20 °С), занурюють в нього електроди і через 10-15 с зчитують покази рН-метра. Якщо покази відрізняються від стандартного значення рН вірцевого буферного розчину більше як на 0,05, то рН-метр настраюють з допомогою регулятора.

Для визначення активної кислотності в склянку наливають 40 см³ молока (20 °С) і занурюють в нього електроди. При цьому електроди не повинні торкатися стінок і дна склянки. Через 10-15 с зчитують покази на шкалі рН-метра. Перед наступним вимірюванням електроди необхідно промити дистильованою водою. Між вимірюваннями електроди повинні знаходитись у склянці з дистильованою водою.



Рисунок 29 – Іономір ЭВ-74

За кінцевий результат беруть середньоарифметичне значення двох паралельних вимірів рН. Розбіжність між результатами не повинна перевищувати 0,03 одиниці рН.

Значення активної кислотності молока в одиницях рН можна з певним наближенням перевести в градуси Тернера. Г. Крусъ і співавтори (2002 р.) для цього запропонували наступні співвідношення (табл.24).

Таблиця 24 – Співвідношення між значеннями рН і титрованої кислотності (°Т) молока

Титрована кислотність, °Т	Межі значень рН	Середнє значення рН
16	6,75 – 6,72	6,73
17	6,71 – 6,67	6,69
18	6,67 – 6,61	6,64
19	6,60 – 6,55	6,58
20	6,54 – 6,49	6,52
21	6,48 – 6,44	6,46
22	6,43 – 6,39	6,41
23	6,38 – 6,34	6,36
24	6,33 – 6,29	6,31
25	6,28 – 6,24	6,26
26	6,23 – 6,19	6,21
27	6,18 – 6,14	6,16

8.4. Визначення в'язкості молока (за О. Охріменко, К. Горбатовою, А. Охріменко, 2005)

Це важливий показник для молока і концентрованих молочних продуктів (згущене молоко, розчини казеїнатів, розчини лактози). Можна уявити, що такі

розчини складаються з тонких шарів, які прилягають один до одного. При витягуванні пластинки з розчину ці шари рухаються один вздовж одного з різною швидкістю. (рис. 30). Зусилля на витягування пластинки спричинені подоланням сил взаємодії між молекулами шарів, які рухаються один вздовж іншого. Зчеплення шарів рідини діє як тертя і тому називається внутрішнім тертям рідини. Внутрішнє тертя перешкоджає руху швидких шарів і прискорює повільні шари. Це відбувається до вирівнювання швидкості. Таке явище називається в'язкістю речовини.

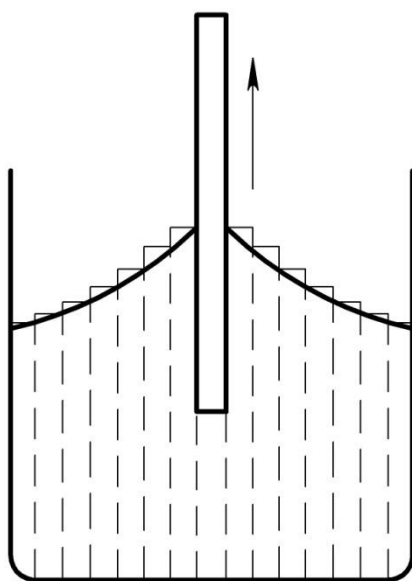


Рисунок 30 – Утворення шарів рідини при витягуванні пластинки з в'язкого розчину

Мірою сили, яка протидіє в'язкому зміщенню шарів, є коефіцієнт внутрішнього тертя – η , який називається коефіцієнтом динамічної в'язкості або динамічною в'язкістю. Коефіцієнт внутрішнього тертя – сила, яка необхідна для відносного руху двох сусідніх шарів даного середовища, віддаль між якими складає 1 см з градієнтом швидкості 1 см/сек. У системі СІ за одиницю динамічної в'язкості прийнято паскаль·секунду (Па·с). На практиці частіше використовують одиниці в'язкості – пуаз (П) або Н·с/м². Пуаз – це

сила, в 1 дину, яку потрібно прикласти до одиниці площі (1 см²), щоб перемістити дві паралельні поверхні рідини одна відносно одної на 1 см зі швидкістю 1 см/с.

$$1 \text{ П} = 0,1 \text{ Н} \cdot \text{с} \cdot \text{м}^{-2}$$

В'язкість молока не залежить від швидкості зсуву (ньютонівська рідина) і становить $1,1-2,5 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$ при 20 °С. На в'язкість молока впливає величина міцел казеїну, їх гідратація. Мало впливають на в'язкість лактоза, низькомолекулярні розчинні речовини, а також жир. В'язкості жирного і знежиреного молока мало відрізняються. Вміст жиру впливає на в'язкість при великих концентраціях. При згущенні молока в'язкість зростає.

Структурна (ефективна) в'язкість характерна для таких молочних продуктів, як сметана, вершки, масло, кисломолочні напої. Величина такої в'язкості залежить від напруги зсуву і градієнту швидкості. В'язкість молока визначають віскозиметром Оствальда (рис. 31), в'язкість згущеного молока – віскозиметром Геплера, а в'язкість кисломолочних продуктів – ротаційним віскозиметром.

При роботі з віскозиметром Оствальда для розрахунків в'язкості застосовують формулу Ж. Пуазейля або на її основі визначають відносну в'язкість. Для визначення відносної в'язкості крім молока досліджують рідину з відомою в'язкістю.

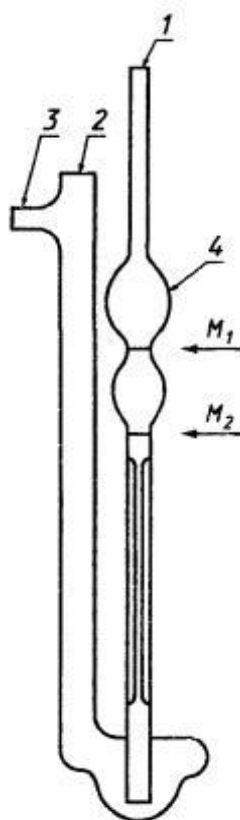


Рисунок 31 – Віскозиметр Оствальда (ВПЖ-2)

Матеріали, реактиви, обладнання

Молоко, дистильована вода, віскозиметр Оствальда (ВПЖ-2), піпетки на 10 см³, ртутний термометр, секундомір, штатив, затискачі, гумова трубка з грушою, великий скляний циліндр.

Хід визначення

Віскозиметр закріплюють вертикально на штативі і одночасно розміщують у великому циліндрі. В циліндр наливають дистильовану воду з температурою 20 °С. Далі в широкий отвір віскозиметра піпеткою вносять 10 см³ дистильованої води з температурою 20 °С. З допомогою гумової трубки через вузький отвір втягують воду у верхнє розширення (на 1 см вище від верхньої позначки). Далі ослаблюють затискач на резиновій трубці і дають можливість воді вільно витікати через капіляр. Коли рівень води дійде до верхньої позначки секундомір включають, а коли до нижньої – виключають. Дослід повторюють 3 рази. Після цього воду виливають з віскозиметра і

промивають його досліджуваним молоком. Заливають свіжу порцію молока (20 °С) і тричі вимірюють час його проходження через капіляр. Для розрахунків використовують середні значення часу витікання води і молока. Для розрахунків в'язкості паралельно проводять визначення густини молока з допомогою ареометра.

Обчислення відносної в'язкості досліджуваного молока проводять за формулою, виведеною на основі формули Ж. Пуазейля:

$$\eta_{\text{м}} = \eta_{\text{в}} \frac{\rho_{\text{м}} \cdot t_{\text{м}}}{\rho_{\text{в}} \cdot t_{\text{в}}} \text{ (Па}\cdot\text{с)},$$

де $\eta_{\text{м}}$ – в'язкість досліджуваного молока при 20 °С, Па·с;

$\eta_{\text{в}}$ – в'язкість води при 20 °С, Па·с ($\eta_{\text{в}} = 2,005 \cdot 10^{-3}$ Па·с);

$\rho_{\text{м}}$ і $\rho_{\text{в}}$ – відповідно густина досліджуваного молока і води при 20 °С, кг/м³ ($\rho_{\text{в}} = 998,2$ кг/м³);

$t_{\text{м}}$ і $t_{\text{в}}$ – тривалість протікання через капіляр досліджуваного молока і води відповідно, с.

Запитання для самоконтролю

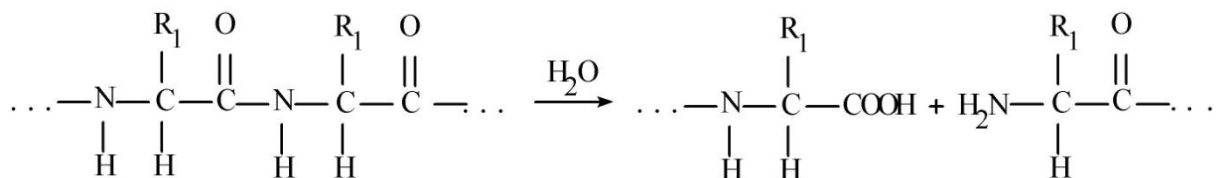
1. З яких дисперсних систем складається молоко? Дайте їх коротку характеристику.
2. Якими показниками характеризують фізико-хімічні властивості молока?
3. Як правильно визначити температуру молока?
4. Охарактеризуйте методику визначення густини молока.
5. В чому полягають особливості визначення густини молока при різних температурах?
6. Якими показниками характеризують кислотність молока?
7. Чим відрізняється титрована кислотність від активної кислотності?
8. Чим зумовлена буферна ємність молока? Які сполуки формують буферну систему молока?

9. Опишіть послідовність операцій при визначенні титрованої кислотності молока.
10. Що таке гранична кислотність і як її визначають у молоці?
11. Як визначають активну кислотність у молоці?
12. Якими видами в'язкості характеризують молоко і молочні продукти? Які фактори впливають на в'язкість?
13. Опишіть методику визначення в'язкості молока на капілярному віскозиметрі Оствальда.

Лабораторна робота № 9

ПРОТЕОЛІТИЧНІ ПРОЦЕСИ В МОЛОЦІ І МОЛОЧНИХ ПРОДУКТАХ

Протеолітичні ферменти каталізують реакцію гідролітичного розщеплення пептидних зв'язків в молекулах білків і пептидів:



На сьогоднішній день описано більше 1000 протеолітичних ферментів із різних організмів. Відповідно до сучасної класифікації протеолітичні ферменти відносяться до класу гідролаз (клас 3), підкласу пептидгідролаз (підклас 4). Підклас пептидгідролаз в свою чергу поділяється на підпідкласи, які складаються з окремих представників. Кожен фермент має свій номер або шифр. Наприклад фермент гліцил-L-лейцингідролаза має шифр 3.4.13.2. Перша цифра означає, що фермент відноситься до класу гідролаз (клас 3), друга цифра – фермент відноситься до підкласу пептидгідролаз (підклас 4), третя цифра – фермент відноситься до підпідкласу дипептидгідролаз (підпідклас 13) і остання цифра вказує на порядковий номер ферменту. При написанні шифру ферменту на початку ставлять дві букви КФ (класифікація ферменту), а цифри між собою розділяють крапками. Класифікація і представники підкласу пептидгідролаз показані в табл. 25.

Як видно із наведеної класифікації пептидгідролази поділяються на дві групи: пептидази і протеїнази. Дія перших направлена на пептидні зв'язки, утворені за участі кінцевих амінокислот. Протеїнази розщеплюють пептидні зв'язки центральних ділянок молекул білків. Невеликі пептиди вони розщеплюють, коли їх кінцеві групи блоковані. Для повного гідролізу білків (в травному тракті) обидві групи діють одночасно. Пептидази класифікують за положенням зв'язку, який вони атакують в пептидному ланцюгу, а протеїнази – за будовою їх активного центру.

Таблиця 25 – Класифікація і коротка характеристика протеолітичних ферментів (пептидгідролаз 3.4.)

Підпідкласи підкласу пептидгідролаз	Коротка характеристика
<i>Пептидази або екзопептидази (3.4.11-3.4.17)</i>	
Амінопептидази (3.4.11)	Гідролізують пептидні зв'язки, починаючи з першого від N-кінця поліпептидного ланцюга
Карбоксипептидази (3.4.16-17)	Гідролізують пептидні зв'язки, починаючи з першого від C-кінця
Дипептидази (3.4.13.)	Гідролізують пептидні зв'язки дипептидів з утворенням двох амінокислот
Дипептидилпептидази (3.4.14.)	Каталізують відщеплення дипептидів з N-кінця поліпептидного ланцюга
Пептидилдипептидази (3.4.15.)	Каталізують відщеплення дипептидів з C-кінця поліпептидного ланцюга
<i>Протеїнази або ендопептидази (3.4.21-3.4.24)</i>	
Серинові протеїнази (3.4.21)	Містять в активному центрі залишки амінокислот серину і гістидину. Характерні представники – трипсин і хімотрипсин з підшлункової залози
Цистеїнові або тіолові протеїнази (3.4.22)	Містять в активному центрі залишок амінокислоти цистеїну. Характерні представники – рослинні ферменти (папаїн, фіцин)
Кислі або аспарагінові протеїнази (3.4.23)	Містять в активному центрі карбоксильні групи залишків кислих амінокислот. Типові представники цього підпідкласу – пепсин і хімосин з шлункового соку
Металовмісні протеїнази (3.4.24)	Містять в активному центрі іони металів (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+}). У більшості випадків це протеази мікроорганізмів.

В природі пептидгідролази знаходяться у всіх живих організмах, починаючи від вірусів і закінчуючи організмом людини. За своєю локалізацією розрізняють позаклітинні і внутрішньоклітинні протеази. Перші секретуються мікроорганізмами в оточуюче середовище або присутні у різних біологічних

рідинах – крові, лімфі, шлунковому сокові і т.д. Другі зазвичай локалізовані в субклітинних структурах – мітохондріях, лізосомах, мікросомах і, як правило, зв'язані з мембранами клітин. Протеази беруть участь в процесах утилізації білків організмами, регуляції обміну речовин (модифікація ферментів і регуляторних білків), біосинтезі білків. Широко застосовуються протеолітичні ферменти у харчовій промисловості, зокрема в технології виробництва молочних продуктів.

Ферменти, які приймають участь у протеолітичних процесах під час виробництва молока, можна розбити на декілька груп. Це, в першу чергу, природні протеази молока – плазмін (КФ 3.4.21.7) або лужна протеаза молока і катепсин (КФ 3.4.23.5) або кисла протеаза молока. Вони потрапляють у молоко з крові і беруть участь (в основному плазмін) в утворенні більшості компонентів протеозо-пептонної фракції молока. Біологічне значення цих ферментів в молоці остаточно не встановлене.

Другою важливою групою протеолітичних ферментів в молоці і молочних продуктах є ферменти молочнокислих бактерій. Лактококи і лактобацили, які ростуть у молочному середовищі, є ауксотрофами по ряду амінокислот (від 6- до 14-ти). Тому їх здатність рости у молоці залежить від активності протеолітичної системи, яка забезпечує звільнення есенціальних амінокислот в процесі розщеплення білків молока (в першу чергу казеїну), які бактерії використовують у синтезі своїх білків. Одночасно, ці протеолітичні ферменти впливають на органолептичні показники та біологічну цінність молочних продуктів. Особливо важлива їх роль при виробництві твердих сирів.

До третьої групи можна віднести протеолітичні ферменти, які додають в молоко і молочні продукти для забезпечення певних технологічних процесів. До них можна віднести молокозсідальні протеолітичні препарати (для виготовлення сичужних сирів, а також для виробництва сичужного казеїну), протеолітичні препарати для гідролізу білків молока (отримання гідролізатів різного призначення), протеази для регуляції функціональних властивостей

білків молока та білкових молочних продуктів (в'язкості, розчинності, піноутворення та ін.).

В окрему групу протеолітичних процесів можна виділити утворення біологічно активних пептидів з білків молока. В останні роки встановлено, що казеїни і білки сироватки молока є попередниками більше 500 різних видів біологічно активних пептидів (БАП), які можуть позитивно впливати на фізіологічні процеси в організмі (рис. 32).

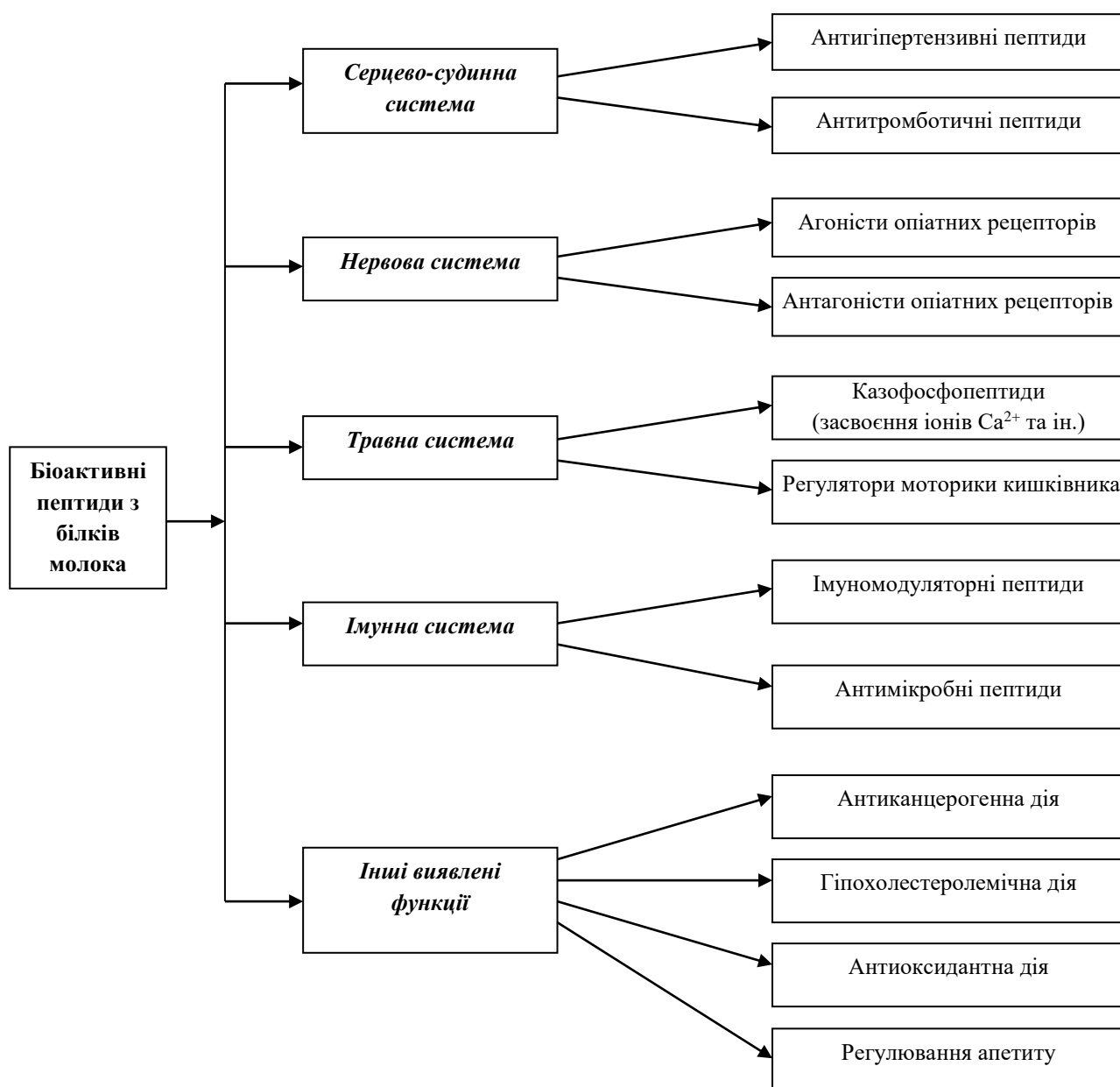


Рисунок 32 – Функції біоактивних пептидів з білків молока

Показано, що БАП з білків молока є стійкими до травних протеаз, можуть потрапляти у кров'яне русло і виявляти свою біологічну дію. Доведено, що БАП можуть утворюватись в результаті дії протеолітичних ферментів під час виробництва молочних продуктів. Шляхи утворення БАП в молочних продуктах узагальнені на рис. 33.

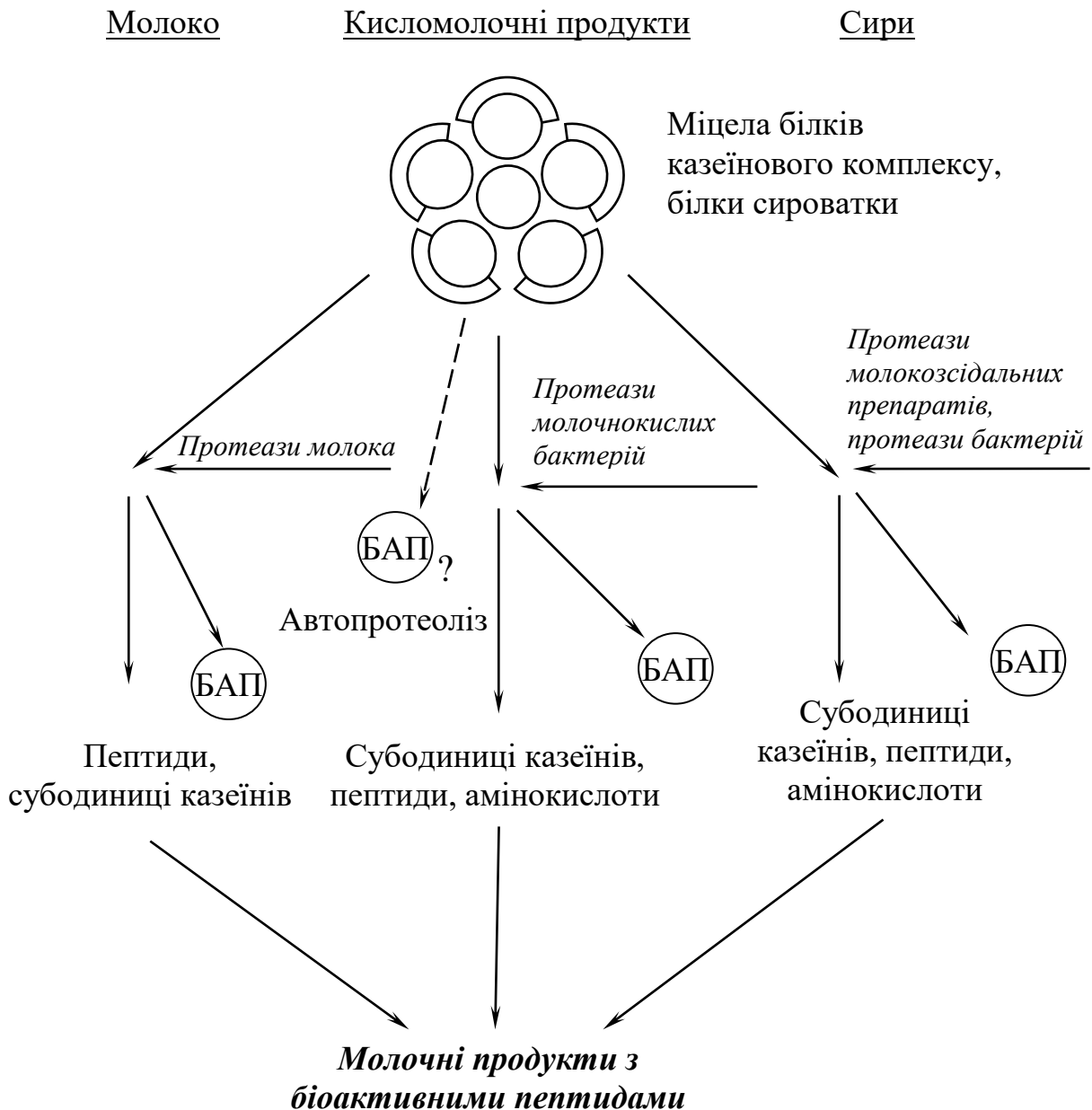


Рисунок 33 – Можливі шляхи утворення біологічно активних пептидів (БАП) з білків молока (В. Юкало, 2007)

Явище утворення БАП з білків молока суттєво розширює наші уявлення про біологічну цінність молока, а також може бути використане для створення нового класу молочних функціональних продуктів.

9.1. Характеристика активності і специфічності дії молокозсідальних препаратів

Молокозсідальні ферменти здатні викликати зсідання молока шляхом специфічного протеолізу казеїнів. Протеоліз білків сироватки молока не відіграє суттєвого значення у цьому процесі. Молокозсідальні ферменти використовуються при виробництві твердих сирів. Традиційно при виготовленні сирів застосовують так званий «сичужний фермент», виділений з сичугу телят, яких годували молоком. До складу сичужного ферменту входить, як основний компонент, природна молокозсідальна протеїназа – хімозин (КФ 3.4.23.4). Хімозин синтезується у перші 2-3 тижні життя під час молочного живлення у вигляді неактивного проферменту хімозиногену (373 амінокислотні залишки). Хімозиноген активується при рН менше 6,5. При цьому звільняється N-термінальний активуючий пептид (42 амінокислотні залишки), внаслідок чого молекулярна маса знижується з 36 000 Да до 30 700 Да. Встановлено, що хімозин відноситься до кислих протеаз. Оптимум рН дії хімозину при розщепленні сироваткового альбуміну і казеїну становить 3,4 і 4,0 відповідно. Протеолітична активність хімозину проявляється вже при температурі 0 °С і досягає максимального рівня при температурі 40 °С. Подальше збільшення температури приводить до зменшення активності ферменту і повної втрати її при температурі 60 °С. Хімозин характеризується високою молокозсідальною і низькою протеолітичною активністю. Фізіологічне значення дії хімозину полягає в утворенні згустку білків казеїнового комплексу в шлунку телят і кращому їх засвоєнні.

Коагуляція казеїнових міцел хімозином – складний і багатостадійний процес, деталі його до кінця не з'ясовані. Це зумовлено в першу чергу

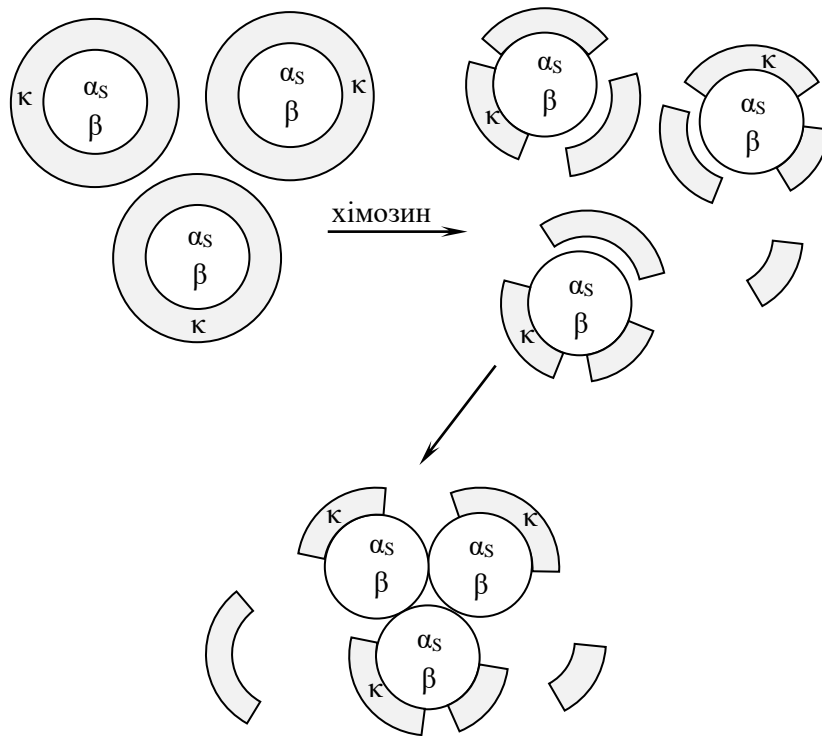
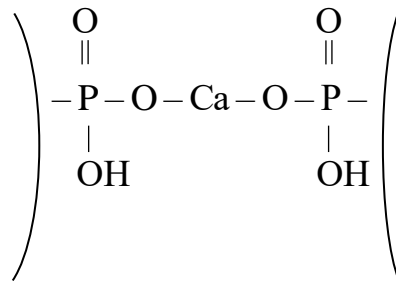


Рисунок 34 – Схематичне представлення агрегації казеїнових міцел за дії хімозину



Рисунок 35 – Утворення згустку в молоці при його коагуляції хімозином

Певну роль в коагуляції казеїну відіграє також процес утворення кальцій-фосфатних мостиків між сусідніми міцелами:



Крім хімозину, молокозсідальною активністю володіють також інші протеїнази різного походження. Це добре вивчені тваринні протеїнази – пепсин, рослинні протеїнази – папаїн і фіцин, а також цілий ряд молокозсідальних ферментів мікробіологічного походження. Всі ці ферменти розщеплюють к-казеїн, що спричиняє агрегацію казеїнових міцел. Це так званий, специфічний протеоліз казеїнових міцел молокозсідальними ферментами. Крім того, ці ферменти, на відміну від хімозину, активно розщеплюють всі казеїнові фракції (неспецифічний протеоліз). Співвідношення протеолітичної і молокозсідальної активності у цих ферментів значно вище, ніж у хімозину. Багато робіт було присвячено пошукам замітника дефіцитного хімозину, проте до сьогоднішнього дня не знайдено в природі протеїназу, яка б повністю відповідала вимогам до молокозсідального ферменту. В зв'язку з цим все більшого поширення набуває рекомбінантний хімозин. Його виробляють бактерії (*Escherichia coli*), мікроскопічні гриби (*Aspergillus niger*) або дріжджі (*Kluyveromiceslactis*) після включення в їх геном гену хімозину телят.

9.1.1. Визначення молокозсідальної активності

Промислові препарати хімозину називаються сичужним ферментом. Під активністю сичужного ферменту розуміють кількість частин молока, яке зсідається однією частиною ферменту при 35 °С протягом 40 хв. Це означає, що під дією 1 г ферменту активністю 100 000 одиниць може зсідати 100 000 г або 100 кг молока за вказаних умов.

Матеріали, реактиви і обладнання

Молоко, стандартний сичужний фермент активністю 100 000 умовних одиниць, препарат сичужного ферменту з невідомою активністю, дистильована вода, склянки на 50 см³, мірні колби на 100 см³, циліндр на 50 см³, скляні палички, аналітична вага, рН-метр, термостати, два секундоміри.

Хід визначення

Відважують по 1 г з точністю до 0,001 г дослідного і стандартного препарату сичужного ферменту, вносять у мірні колби на 100 см³ і розчиняють у дистильованій воді при 35 °С протягом 20 хв. В дві склянки на 50 см³ відмірюють циліндром по 50 см³ молока, нагрівають в термостаті до 35 °С. В молоці попередньо визначають рН або кислотність. В одну склянку з молоком вносять піпеткою 0,5 см³ розчину стандартного сичужного ферменту. В другу склянку вносять 0,5 см³ розчину дослідного препарату ферменту. Молоко з ферментами перемішують протягом 3-5 с. Безпосередньо після внесення розчинів ферментів включають секундоміри. Тривалість зсідання молока ферментними препаратами визначається за секундоміром, починаючи з моменту внесення ферменту в молоко до появи згустків, що встановлюється візуально шляхом обережного нанесення молока на стінки склянок за допомогою скляної палички.

Загальну молокозсідальну активність E дослідного препарату сичужного ферменту визначають за формулою:

$$E = \frac{E_{ст} \cdot T_{ст}}{T},$$

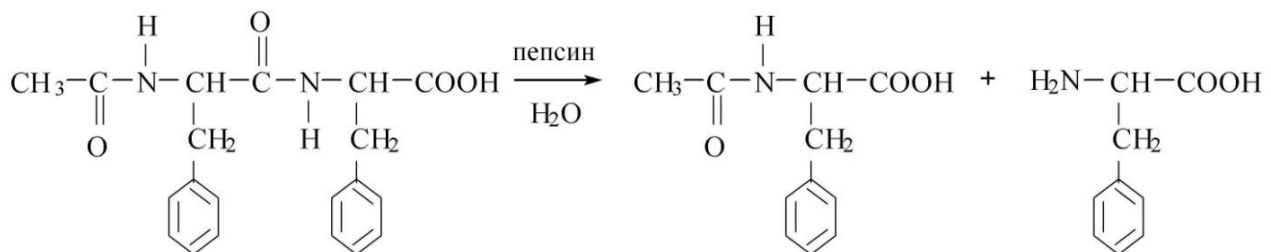
де $E_{ст}$ – активність стандартного препарату ферменту;

$T_{ст}$ – тривалість зсідання молока стандартним препаратом, с;

T – тривалість зсідання молока дослідним препаратом, с.

9.1.2. Визначення протеолітичної активності

Активність протеолітичних ферментів можна визначити за допомогою різних методів, вибір яких обумовлений природою субстрату. При використанні у якості субстрату білків (казеїн, гемоглобін) можна визначити гідролізований білок після осадження трихлороцтовою кислотою методом К'ельдаля або колориметрією. Активність протеаз також можна оцінити на основі прямого титрування карбоксильних груп, що звільняються, але при умові, що не відбувається їх електростатична взаємодія із звільненими при гідролізі аміногрупами. Уникнути цього можна за допомогою етанолу (зсуває рівновагу дисоціації) або при нагріванні з формальдегідом, який взаємодіє в цих умовах з аміногрупами. Використовують також синтетичні пептиди, які відповідають умовам специфічності ферментів. Так, дипептид, структура якого приведена нижче, гідролізується пепсином:



Амінокислоти, що звільняються при гідролізі пептидів, можна визначити за допомогою нінгідрину.

В даній роботі визначення активності проводиться за методом Ансона. В основі методу лежить визначення концентрації продуктів протеолізу білків за допомогою реактиву Фоліна. Білок, що не гідролізувався ферментом, осаджують трихлороцтовою кислотою. За одиницю протеолітичної активності приймають кількість ферменту, яка за 1 хв при 30 °С дає продукти протеолізу, що відповідають вмісту 1 мкмоль тирозину (1 мкмоль тирозину – 0,181 мг).

Матеріали, реактиви і обладнання

Ферментний препарат; 2 % розчин казеїнату натрію; універсальний буфер; 0,3 моль/дм³ розчин трихлороцтової кислоти; 0,2 моль/дм³ розчин хлоридної кислоти; 0,5 моль/дм³ розчин карбонату натрію; реактив Фоліна; тирозин; склянки на 50 см³; колби мірні на 50, 100, 1000 см³; пробірки; піпетки; фотометр КФК-3; термостат; центрифуга.

Приготування реактиву Фоліна. В круглдонну колбу (2 дм³) вносять 100,00 г вольфрамату натрію $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і 25,00 г молібдату натрію $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 700 см³ дистильованої води, 50 см³ 85 % розчину ортофосфатної кислоти ($\rho=1869$ кг/дм³) і 100 см³ концентрованої хлоридної кислоти. До колби приєднують зворотний холодильник і кип'ятять суміш на слабкому протягом 10 год. Після охолодження в колбу додають 150,00 г сульфату літію, 50 см³ дистильованої води і 5 крапель бром. Суміш кип'ятять 15 хв для видалення бром. Після охолодження об'єм розчину доводять дистильованою водою до 1 дм³ і фільтрують через скловату. Перед використанням приготовлений реактив розбавляють дистильованою водою, щоб отримати розчин з молярною концентрацією кислот 1 моль/дм³ (приблизно в два рази). Зберігають реактив Фоліна в посудині з темного скла.

Хід визначення

Побудова калібрувальної кривої. В 1 дм³ 0,2 моль/дм³ розчину хлоридної кислоти розчиняють 181,2 мг тирозину (вихідний розчин). Із вихідного розчину готують розведені розчини з різною концентрацією тирозину. Для цього в мірні колби на 50 см³ вносять вихідний розчин в кількостях, вказаних в таблиці:

№ колби	Кількість вихідного розчину, см ³	Концентрація тирозину, мкмоль/см ³	Оптична густина (670 нм)
1	1	0,02	
2	2	0,04	
3	4	0,08	
4	5	0,10	
5	7,5	0,15	
6	10	0,20	
7	15	0,30	

Об'єм в колбах доводять до позначки 0,2 моль/дм³ розчином хлоридної кислоти. В сім пробірок вносять 1 см³ розчину тирозину різної концентрації, додають до них по 5 см³ 0,5 моль/дм³ розчину карбонату натрію і 1 см³ реактиву Фоліна. Для контрольного взірця замість розчину тирозину беруть 1 см³ дистильованої води. Через 20 хв розчини колориметрують при 670 нм і будують калібрувальну криву. Для цього на осі абсцис відкладають концентрацію тирозину С (в мкмоль/см³), на осі ординат – відповідні значення оптичної густини Е. Тирозиновий еквівалент визначають із співвідношення:

$$TE = \frac{E}{C}$$

Приготування ферментного розчину. 0,1-1,0 г досліджуваного препарату розмішують в склянці з невеликою кількістю буферу. Потім вміст склянки переносять у мірну колбу на 100 см³ і доводять об'єм тим же буферним розчином до позначки.

Із одержаного розчину готують шляхом розведення робочий розчин з необхідною концентрацією ферменту. Розведення повинне бути підібране так, щоб у реакційному середовищі був надлишок субстрату, а вимірювані оптичні

густини при колориметруванні в кюветі з робочою довжиною 10 мм знаходилися в межах від 0,1 до 0,75.

Визначення активності. В одну пробірку наливають 2 см³ 2 % розчину казеїнату натрію, в другу 2 см³ розчину ферментного препарату, витримують їх 10 хв при температурі 35 °С. Після цього розчини ферментного препарату і казеїнату натрію змішують і витримують при 35 °С протягом 30 хв. Відбувається протеоліз. Для інактивації ферменту в пробірки додають 4 см³ 0,3 моль/дм³ трихлороцтової кислоти, перемішують і залишають пробірки ще на 20 хв при кімнатній температурі. Після цього вміст пробірок фільтрують або центрифугують, в сухі пробірки вносять по 1 см³ фільтрату, 5 см³ розчину карбонату натрію (0,5 моль/дм³), перемішують і додають по 1 см³ реактиву Фоліна. Через 20 хв визначають оптичну густина розчину на фотометрі при 670 нм відносно контрольної проби. Для отримання контрольної проби 2 см³ ферментного препарату додають до 4 см³ 0,3 моль/дм³ розчину трихлороцтової кислоти, витримують при кімнатній температурі 10 хв, а потім додають 2 см³ субстрату. Після перемішування пробірку витримують при кімнатній температурі ще 20 хв, суміш фільтрують і відбирають 1 см³ фільтрату. До нього додають 5 см³ розчину карбонату натрію і 1 см³ реактиву Фоліна. Одержаний розчин використовують як контроль при вимірюваннях оптичної густини.

Протеолітичну активність (ПА) препарату (од/г) визначають за формулою:

$$ПА = \frac{4 \cdot E}{TE \cdot 30 \cdot A} 1000,$$

де 4 – відношення об'ємів реакційної суміші і розчину ферменту після додавання трихлороцтової кислоти;

TE – тирозиновий еквівалент;

30 – час гідролізу (хв);

A – кількість ферментного препарату в пробі.

9.1.3. Визначення специфічності протеолітичної дії молокозсідальних препаратів

Важливими питаннями при характеристиці молокозсідальних препаратів, окрім молокозсідальної і загальної протеолітичної активності, є специфічність їх протеолітичної дії по відношенню до різних фракцій казеїну. Відомо, що найбільш сприятлива для сироробства специфічність протеолізу характерна для хімозину. За дії хімозину на білки молока відбувається розщеплення в основному κ -казеїну, який знаходиться на поверхні казеїнових міцел (субміцел) і стабілізує інші казеїни від агрегації та утворення згустку. Відщеплення гідрофільної частини κ -казеїну, яка називається глікомакропептидом, дестабілізує казеїнову міцелу і призводить до утворення агрегатів і згустку. При цьому хімозин майже не розщеплює інші казеїнові фракції – α_{S1} -CN, β -CN, α_{S2} -CN. Таким чином зсідання молока відбувається за мінімального протеолізу. Це зменшує втрати білків при виробництві сирів. Другим важливим аспектом специфічності протеолізу хімозином є відсутність гірких пептидів. Ці пептиди утворюються як наслідок так званого «неспецифічного» протеолізу α_{S1} -CN і β -CN фракцій казеїну і негативно впливають на смакові властивості сирів.

У зв'язку з цим молокозсідальні препарати необхідно характеризувати не тільки за молокозсідальною та загальною протеолітичною активністю, але і за специфічністю протеолізу казеїнових фракцій. Як приклад, розглянемо хід досліджень специфічності дії молокозсідального препарату «Глек», який виробляється в українських Карпатах і використовується в технологіях традиційних сирів – будзу і бринзи (рис. 36). Виробництво препарату «Глек» вперше науково було описано Г. Рудавською ще в 1954 році. Детальніші дослідження протеолітичних властивостей препарату були проведені в 2013-2015 роках (А. Юкало, 2015).



1

2

3

Рисунок 36 – Молокозсідальні препарати «Глек» різної тривалості зберігання:

1 – один місяць; 2 – один рік; 3 – два роки.

Препарати 1,3 вироблені у Косівському районі Івано-Франківської області,
а препарат 2 – у Ворохті в 2013-2015 роках

Для порівняльної характеристики специфічності протеолізу було взято три молокозсідальні препарати – еталонний сичужний фермент (100 000 одиниць молокозсідальної активності), пепсин і «Глек». Для проведення протеолізу як субстрату було використано три гомогенні фракції казеїнів – κ -CN, α_{S1} -CN, β -CN. Співвідношення фермент: субстрат становило 1:100 для пепсину. Концентрацію інших препаратів задавали так, щоб у них була однакова молокозсідальна активність. Хід протеолізу відслідковували визначенням продуктів протеолізу розчинних у 12 % трихлороцтовій кислоті, а також електрофоретичним аналізом реакційної суміші на 60-й хвилині протеолізу. Результати показані на рис. 37–42.

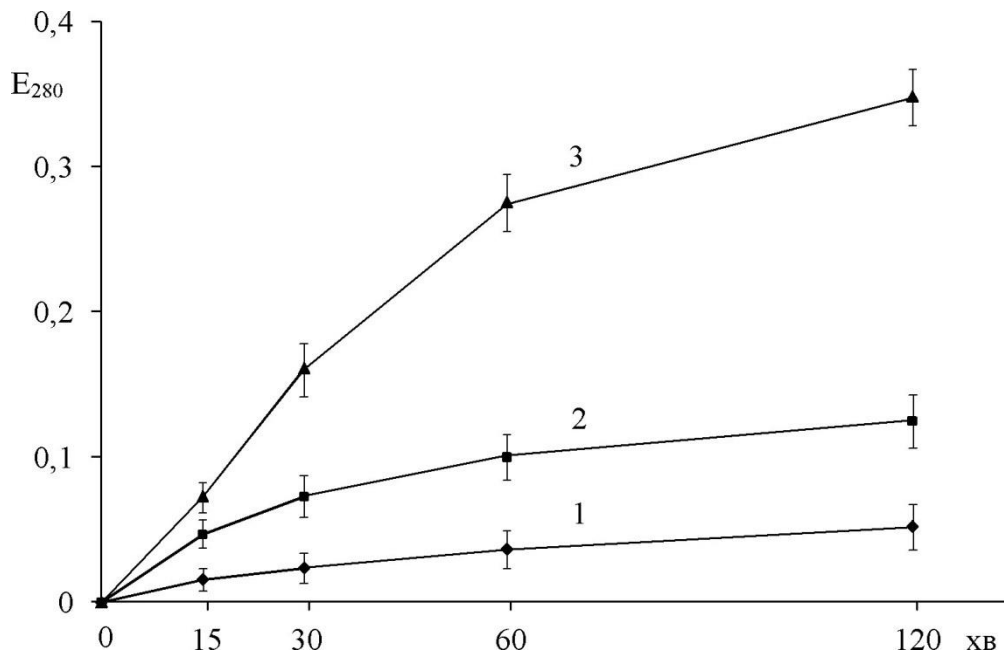


Рисунок 37 – Протеоліз α_{S1} -казеїну:

1 – молокозсідальним препаратом «Глек»; 2 – сичужним ферментом; 3 – пепсином

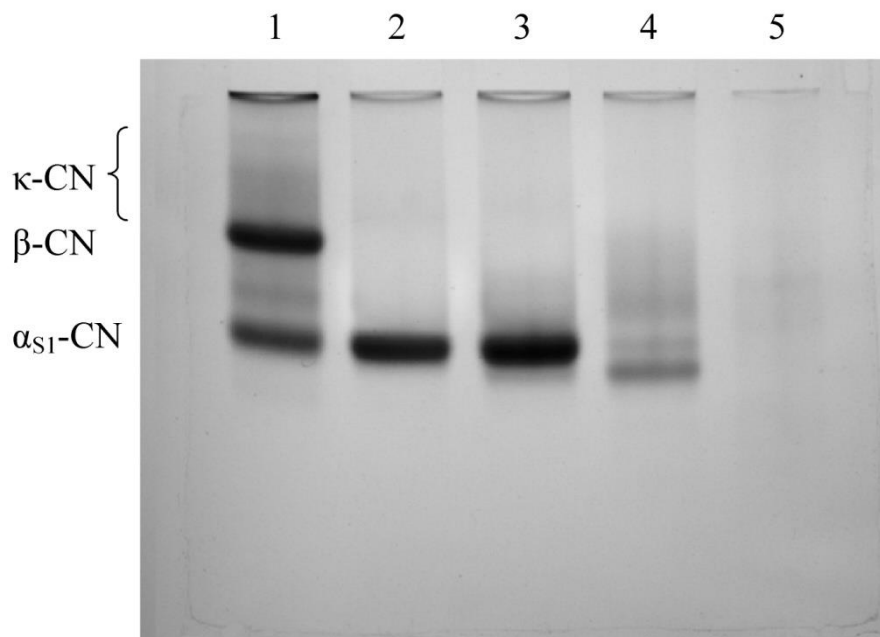


Рисунок 38 – Електрофореграма: 1 – загального казеїну; 2 – α_{S1} -казеїну; 3 – α_{S1} -казеїну після протеолізу препаратом «Глек» (60 хв); 4 – α_{S1} -казеїну після протеолізу сичужним ферментом (60 хв); 5 – α_{S1} -казеїну після протеолізу пепсином (60 хв)

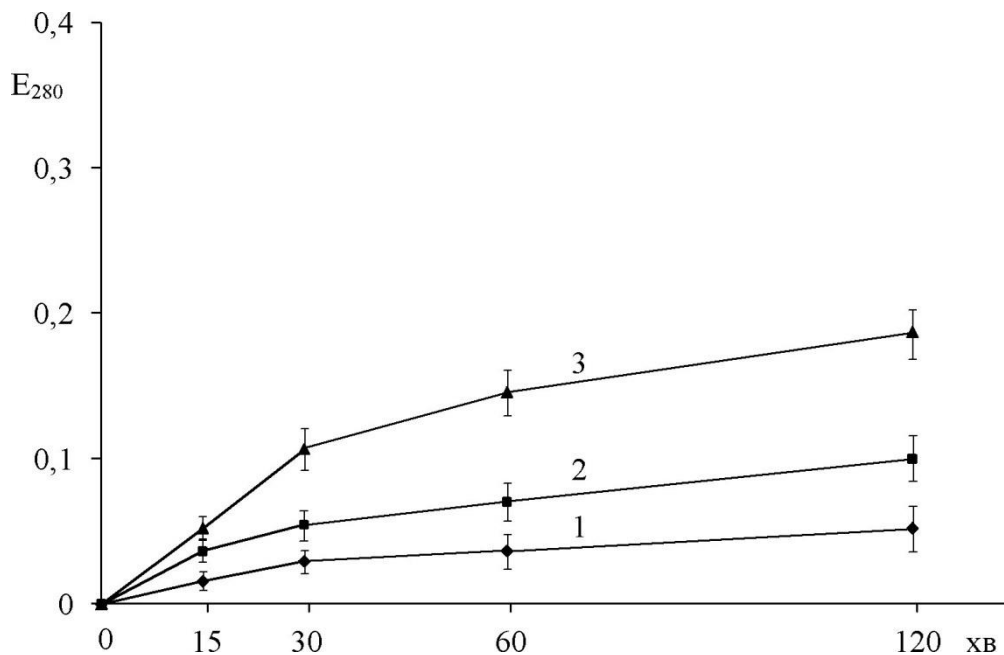


Рисунок 39 – Протеоліз β -казеїну:

1 – молокозсідальним препаратом «Глек»; 2 – сичужним ферментом; 3 – пепсином

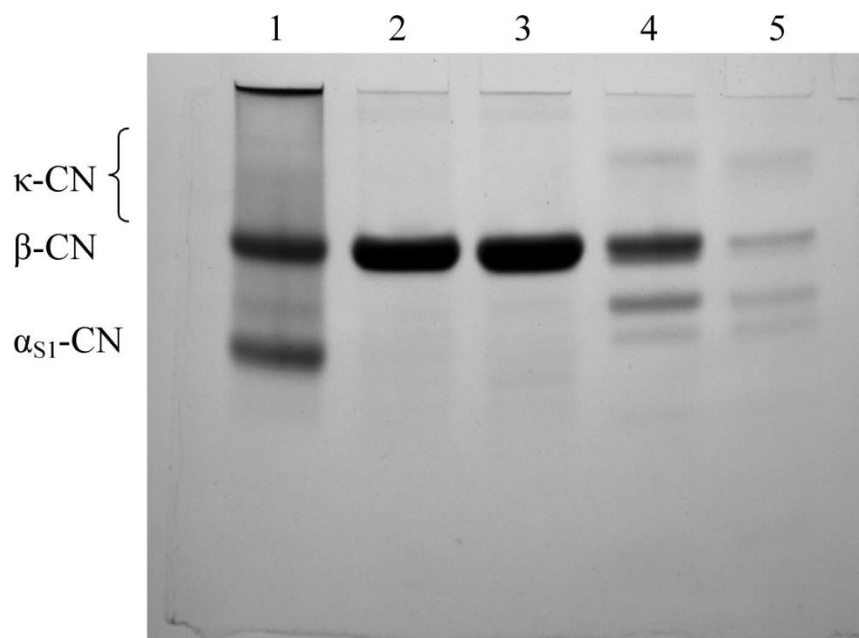


Рисунок 40 – Електрофореграма: 1 – загального казеїну; 2 – β -казеїну; 3 – β -казеїну після протеолізу препаратом «Глек» (60 хв); 4 – β -казеїну після протеолізу сичужним ферментом (60 хв); 5 – β -казеїну після протеолізу пепсином (60 хв)

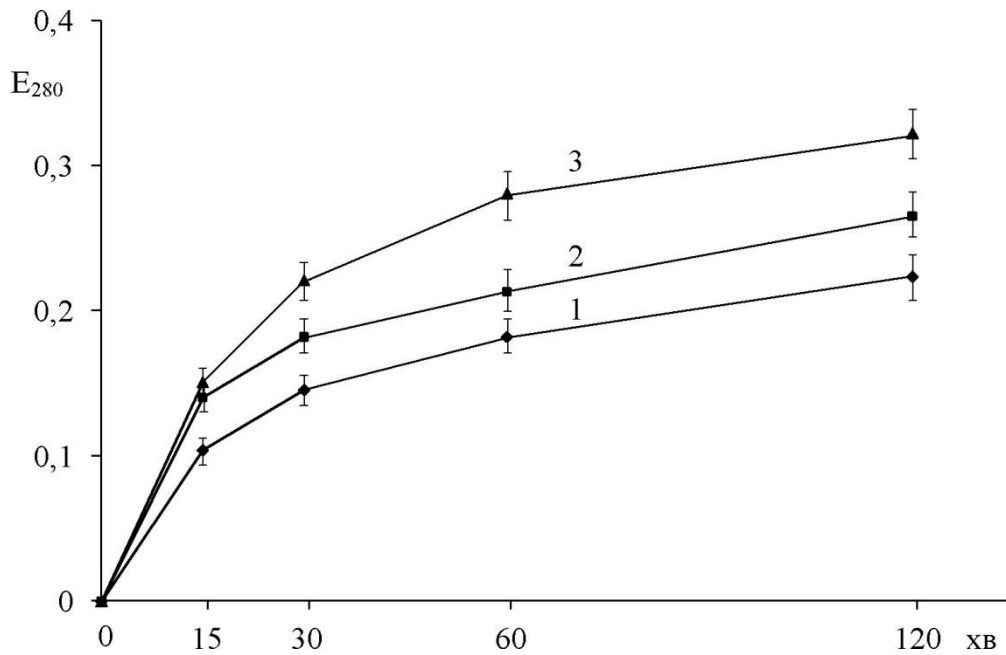


Рисунок 41 – Протеоліз κ-казеїну:

1 – молокозсідальним препаратом «Глек»; 2 – сичужним ферментом; 3 – пепсином

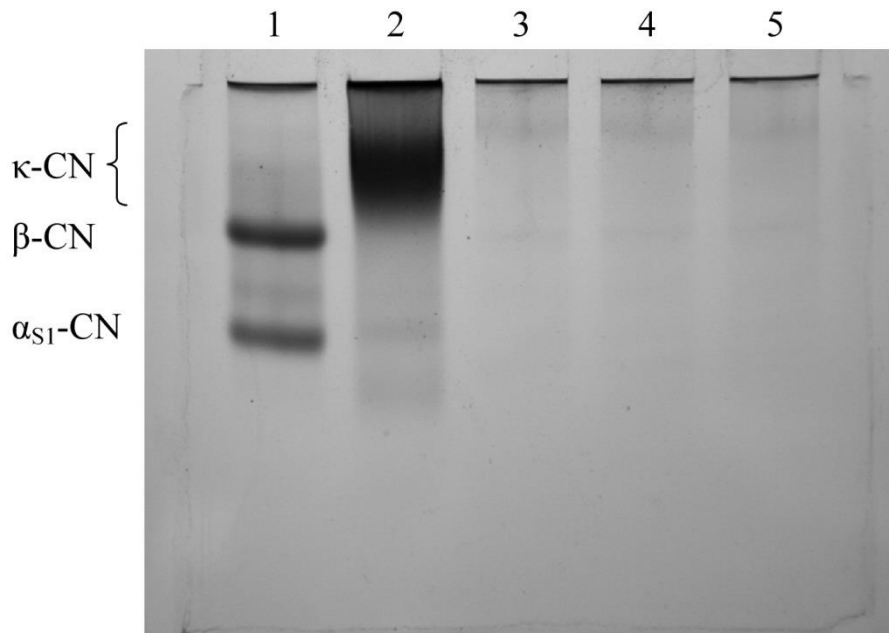


Рисунок 42 – Електрофореграма: 1 – загального казеїну; 2 – κ-казеїну; 3 – κ-казеїну після протеолізу препаратом «Глек» (60 хв); 4 – κ-казеїну після протеолізу сичужним ферментом (60 хв); 5 – κ-казеїну після протеолізу пепсином (60 хв)

Отримані результати свідчать, що препарат «Глек» має специфічність подібну до сичужного ферменту, і практично не розщеплює фракції α_{S1} -CN і β -CN. Отже, «Глек» є цінним природним молокозсідальним препаратом, який за своїми протеолітичними властивостями близький до хімозину.

Матеріал, реактиви, обладнання

Молоко, розчини (0,5%) казеїнів (α_{S1} -CN, β -CN, κ -CN), стандартний сичужний препарат з молокозсідальною активністю 100 000 умовних одиниць, пепсин, невідомий молокозсідальний препарат, реактиви для проведення електрофорезу в ПАГ лужній буферній системі (див. лабораторну роботу № 3), 24 %-на трихлороцтова кислота, реактиви для визначення молокозсідальної активності (див. лабораторну роботу 9.1), пробірки, колби на 50 см³, склянки на 50 см³, циліндри на 50 см³ і на 100 см³, піпетки на 1, 2, 5 і 10 см³, лійки, фільтрувальний папір, мікрошприц, водяний ультратермостат, спектрофотометр СФ – 46.

Хід визначення

Готують по 15 см³ водного розчину кожної казеїнової фракції (α_{S1} -CN, β -CN, κ -CN) концентрацією 1 %. Значення рН кожного розчину повинно бути 7,0. При потребі його можна підкорегувати 0,1 моль/дм³ розчином гідроксиду натрію або хлоридної кислоти. З розчину кожної фракції відбирають по 1 см³ і додають 1 см³ Н₂О та 2 см³ буферу для електрофоретичних взірців (лабораторна робота №3). В результаті отримують три контрольні розчини казеїнових фракцій для електрофорезу.

Далі у чотири пробірки вносять по 3 см³ розчину казеїнової фракції α_{S1} -CN, термостатують 15 хв при 35 °С у водяному ультратермостаті. Після цього в першу пробірку додають 3 см³ розчину пепсину, в другу – 3 см³ розчину стандартного сичужного препарату і в третю – 3 см³ розчину невідомого молокозсідального препарату. Розчин пепсину готують, розчиняючи 10 мг

пепсину у 50 см^3 дистильованої води. Така кількість пепсину забезпечує співвідношення фермент : субстрат, як 1:50. Кількість інших двох препаратів розраховують за формулою:

$$M = \frac{10 \cdot A_{\text{п}}}{A}$$

де M – маса молокозсідального препарату, яку необхідно розчинити в 50 см^3 води, мг ;

$A_{\text{п}}$ – молокозсідальна активність пепсину, умовні одиниці;

A – молокозсідальна активність стандартного сичужного ферменту або невідомого молокозсідального препарату, умовні одиниці;

10 – маса пепсину, яку розчиняли в 50 см^3 води, мг.

Молокозсідальну активність препарату визначають до розрахунку маси. Взяті в результаті кількості препаратів забезпечують їх порівняльні дослідження на фоні однакової молокозсідальної активності.

Паралельно готують контрольні взірці. Для цього до 1 см^3 1 % розчину кожної казеїнової фракції додають спочатку 2 см^3 24 % розчину трихлороцтової кислоти, а потім 1 см^3 дистильованої води. Впливом ферментного препарату, враховуючи його малу концентрацію, можна знехтувати. В результаті отримують 9 дослідних і 3 контрольні взірці.

Для проведення протеолізу дослідні взірці витримують 60 хв при $35 \text{ }^\circ\text{C}$ з періодичним перемішуванням. Після цього з кожного взірця відбирають по $0,5 \text{ см}^3$, додають $0,5 \text{ см}^3$ дистильованої води і 1 см^3 електрофоретичного буферу для взірців. Контрольний взірець кожного субстрату і продукти його протеолізу, отримані за дії трьох молокозсідальних препаратів, аналізують електрофорезом в лужній системі на сухій пластинці ПАГ, як описано в лабораторній роботі № 3.

До $2,5 \text{ см}^3$ (які залишились після відбору $0,5 \text{ см}^3$) дослідних взірців додають по $2,5 \text{ см}^3$ 24 % розчину трихлороцтової кислоти, витримують 10 хв і

фільтрують. У фільтратах вимірюють оптичну густину при 280 нм на спектрофотометрі СФ-46.

Досліджуваний молокозсідальний препарат оцінюють, порівнюючи його дію на казеїнові фракції з пепсином і стандартним сичужним ферментом. Для пепсину характерна висока неспецифічна активність по відношенню до α_{S1} -CN (рис. 37, 38) і β -CN (рис. 39, 40). У сичужного ферменту така активність низька. В той же час, всі молокозсідальні препарати активно розщеплюють κ -CN (рис. 41, 42). Якщо досліджуваний молокозсідальний препарат на фоні однакової молокозсідальної активності проявляє подібну або нижчу протеолітичну активність по відношенню до α_{S1} -CN і β -CN, то його можна віднести до високоякісних молокозсідальних препаратів.

9.2. Характеристика активності протеолітичних систем

молочнокислих бактерій

Протеолітична система молочнокислих бактерій складається з трьох частин:

- 1) протеїнази, які забезпечують розщеплення казеїну до пептидів;
- 2) пептидази, які розщеплюють пептиди до амінокислот;
- 3) транспортна система, яка забезпечує перенесення продуктів протеолізу через цитоплазматичну мембрану.

Протеїнази забезпечують початкове розщеплення казеїнів з утворенням великої кількості олігопептидів. Протеїнази функціонують поза клітинами, а пептидази виявлені в клітинах молочнокислих бактерій. Протеїнази молочнокислих бактерій, які каталізують розщеплення казеїнів, є мономерними сериновими протеїназами з молекулярною масою 180 000-190 000 Да (табл. 26). Вони зв'язані з клітинною стінкою бактерії і мають назву приклітинних протеїназ. Приклітинна протеїназа здатна звільнитися з клітинної стінки при додаванні бактерій до буферного розчину, у якому відсутній кальцій, або за дії на клітини бактерій лізоциму. За специфічністю дії на α_{S1} -CN, β -CN, κ -CN

приклітинні протеїнази лактококів розділили на 2 типи – P_I і P_{III}. Протеїназа P_I розщеплює β-CN і не розщеплює α_{S1}-CN і κ-CN; протеїназа P_{III} гідролізує β-CN, а також α_{S1}- і κ-CN. Всі продукти протеолізу, що утворюються за дії приклітинних протеїназ, знаходяться в середовищі поза бактеріальною клітиною. Їхнє подальше використання бактерією забезпечує спеціальна транспортна система.

Таблиця 26 – Протеїнази молочнокислих бактерій

Види і штами бактерій	Молекулярна маса ¹ , кДа	Субстрат	Тип протеїнази ²	pH ¹ оптимум
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> WG2		κ-, β-казеїни	C	
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> HP		κ-, β-казеїни	C	6,4
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> SKII	187 ⁿ	α _{S1} -, κ-, β-казеїни	C	
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AC1		α _{S1} -, κ-, β-казеїни		
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM1		α _{S1} -, κ-, β-казеїни		
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> H2	180 ^e	κ-, β-казеїни	C	6,0
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> NCD0763		α _{S1} -, κ-, β-казеїни	C	
<i>Lb. casei ssp. casei</i> NH14		β-казеїн	C	
<i>Lb. casei ssp. casei</i> NCD0151			C	6,5
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> CNRZ397	170 ^e	α _{S1} -, β-казеїни	C	5,5
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ303		α _{S1} -, β-казеїни	C	7,5
<i>Lb. helveticus</i> CP709	45 ^e	α _{S1} -, β-казеїни	C	6,5
<i>Lb. helveticus</i> L89	180 ^e	α _{S1} -, β-казеїни	C	7,0

Примітки:

1. Молекулярну масу ферменту визначали шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі (позначка – e) або обчислювали за первинною структурою (позначка – n).
2. Тип протеїнази «C» означає серинову протеїназу.

Пептидази молочнокислих бактерій гідролізують пептиди, які попадають в клітини лактобактерій, до амінокислот. Основні представники пептидаз наведені в табл. 27. Серед великої кількості різних пептидаз молочнокислих бактерій не виявлено ні однієї карбоксипептидази, які розщеплюють пептидний

зв'язок, утворений карбоксильною групою поліпептидного ланцюга та аміногрупою кінцевої амінокислоти.

Таблиця 27 – Пептидази молочнокислих бактерій

Назва ферменту	Субстрат	Штам бактерії	Молекулярна маса, кДа	Четвертинна структура	Тип пептидази ¹
1	2	3	4	5	6
Амінопептидази N PepN	X↓(X) _n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	95	мономер	М
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> LGG	87	мономер	М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	95	мономер	М
		<i>Lb. helveticus</i> ITGL1	97	мономер	М
Амінопептидази C PepC	X↓(X) _n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	50	гексамер	Ц
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	54	тетрамер	Ц
		<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i>	50	гексамер	Ц
Амінопептидази A PepA		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	40	гексамер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> MG1363	38		
		<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i>	45	октомер	М
Трипептидази PepT	X↓X-X	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	52	димер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	52	димер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> IMN-C12	23	тример	Ц
Дипептидази V PepV	X↓X	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	49	мономер	
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	51	мономер	М
		<i>Lb. helveticus</i> SBT2171	50	мономер	М
Пролідази Q PepQ	X↓Про	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	42	мономер	М
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> IFPL731	41	мономер	М
Пролінази R PepR	Про↓X	<i>Lb. helveticus</i> CNBZ32	33	тетрамер	С
		<i>Lb. curvatus</i> DPC2024	32	димер	
Пролінази P PepP	X↓Про-(X) _n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> NCDO763	43	мономер	М
X-проліл-дипептидил-амінопептидаза PepX	X-Про↓(X) _n	<i>L. lactis ssp. lactis</i> H1	83	димер	С
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	59	димер	С
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	95	димер	С
		<i>Lb. helveticus</i> 53/7	91	димер	С
		<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i> ACA-DC4	80	димер	С
Пролінімінопептидази PepI	Про↓X-(X) _n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> HP	50		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> CNRZ397	33		С
		<i>Lb. helveticus</i> 53/7	34	димер	С

Примітка. Тип пептидаз: М – металопептидаза; С – серинова; Ц – цистеїнова пептидаза.

Складна протеолітична система молочнокислих бактерій відіграє важливу роль не лише в забезпеченні їх амінокислотами, але і впливає на показники смаку, запаху і реології молочних продуктів, а також на утворення біологічно активних пептидів. В першу чергу це стосується твердих сирів, в яких відбувається довготривалий протеоліз під час дозрівання. Тому врахування активності і специфічності протеолітичних систем має важливе значення у виробництві молочних продуктів.

9.2.1. Визначення загальної протеолітичної активності молочнокислих бактерій методом М. Гула в модифікації М. Залашка

Цей метод показав стабільний результат і добру відтворюваність у паралельних взірцях. Використання трихлороцтової кислоти створює однакові умови при відборі взірця, хоча при цьому і втрачається з осадом частина високомолекулярних продуктів протеолізу. В основу цього методу покладено спектрофотометричне визначення продуктів протеолізу, які не осаджуються трихлороцтовою кислотою.

Матеріали, реактиви, обладнання

Культура штаму молочнокислих бактерій у знежиреному молоці, знежирене стерилізоване молоко (стерилізацію проводять при 1 атм протягом 12-15 хв), реактив Фоліна (виготовляють як описано в роботі 9.1.2.), 10 % розчин трихлороцтової кислоти, розчин карбонату натрію (у мірній колбі місткістю 0,5 дм³ розчиняють 75 г безводного карбонату натрію і доводять до позначки дистильованою водою), стандартний розчин тирозину і триптофану (80 мг тирозину + 20 мг триптофану розчиняють в 500 см³ дистильованої води), фільтрувальний папір, лійки, пробірки, мірні колби на 50 см³, піпетки на 0,2; 1; 2; 5 і 10 см³, водяний ультратермостат, повітряний термостат, автоклав, спектрофотометр СФ-46.

Хід визначення

Побудова калібрувального графіка. Із стандартного розчину тирозину і триптофану готують розчини з певним вмістом цих амінокислот. При цьому мінімальна концентрація амінокислот становить $0,01 \text{ мг/см}^3$, а інтервали між наступними концентраціями – $0,01 \text{ мг/см}^3$. Отримані розчини обробляють тими ж реактивами і в такій ж послідовності, як і при визначенні протеолітичної активності молочнокислих бактерій і вимірюють оптичну густина при 650 нм на спектрофотометрі СФ-46. На основі отриманих результатів будують калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації тирозину і триптофану.

Для визначення протеолітичної активності досліджуваній штам молочнокислих бактерій засівають у стерилізоване знежирене молоко (посівний матеріал беруть у кількості $0,1 \%$) і витримують 72 год при $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Далі 3 см^3 культури вносять в суху пробірку, додають 2 см^3 дистильованої води і 10 см^3 10% розчину трихлороцтової кислоти. Суміш перемішують, витримують протягом 10 хв і фільтрують. Далі відбирають 5 см^3 фільтрату у плоскодонну колбу, додають 10 см^3 10% розчину карбонату натрію, перемішують і додають 2 см^3 реактиву Фоліна, розведеного перед визначенням дистильованою водою (1:2). Реакційну суміш витримують 45 хв при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ для формування голубого забарвлення. Оптичну густина виміряють при 650 нм на спектрофотометрі СФ-46. Вимірювання проводять проти контролю. Як контроль використовують фільтрат цієї ж партії молока, обробленої за цим же методом, але без додавання штаму молочнокислої бактерії.

Отримані покази оптичної густини перераховують на вміст тирозину і триптофану в $\text{мг}\%$ за калібрувальним графіком. Далі досліджувані штами умовно поділяють на слабкі протеоліти (концентрація амінокислот менше $3 \text{ мг}\%$), середні протеоліти (від 3 до $6 \text{ мг}\%$) і активні протеоліти (більше $6 \text{ мг}\%$). Ця класифікація запропонована для мезофільних лактококів.

Лактобацили за цією класифікацією в основному відносять до активних протеолітів.

9.3. Регуляція в'язкості казеїнових розчинів протеолітичними ферментними препаратами (за В. Юкало, 1984)

Протеолітичні ферментні препарати широко використовуються для модифікації і регуляції функціональних властивостей молока. До таких властивостей відносяться розчинність, піноутворення, здатність утворювати гелі, в'язкість та інші. У кожному випадку для досягнення позитивного ефекту необхідно підібрати відповідний протеолітичний препарат з певною специфічністю, а також умови для проведення протеолізу (рН, температура, концентрація, тривалість).

Розглянемо це на прикладі такої важливої властивості як в'язкість. В першу чергу це стосується концентрованих розчинів казеїну, в'язкість яких зростає експоненціально із збільшенням концентрації. Висока в'язкість концентрованих казеїнових розчинів є одним з лімітуючих факторів при виробництві і використанні казеїну у харчовій промисловості. Для збагачення харчових продуктів цим цінним молочним білком, а також для створення комбінованих продуктів харчування потрібні казеїнові розчини з певними реологічними властивостями. Концентровані казеїнові розчини з низькою в'язкістю необхідні також для збільшення продуктивності процесу сушіння казеїну.

Для зменшення в'язкості 20 %-го казеїнового розчину було використано протеолітичний ферментний препарат реніномукорин. Це комплексний препарат з декількох протеолітичних ферментів отримують з культурального середовища після глибинного культивування мікробіологічного гриба *Mucor sp. renninus*. На рис. 43 показано, як змінюється кінематична в'язкість розчину казеїну і концентрація продуктів протеолізу за дії різних концентрацій

реніномукорину. З графіків (рис. 43) видно, що досягнення мінімальних значень в'язкості відбувається при розщепленні близько 5 % казеїну.

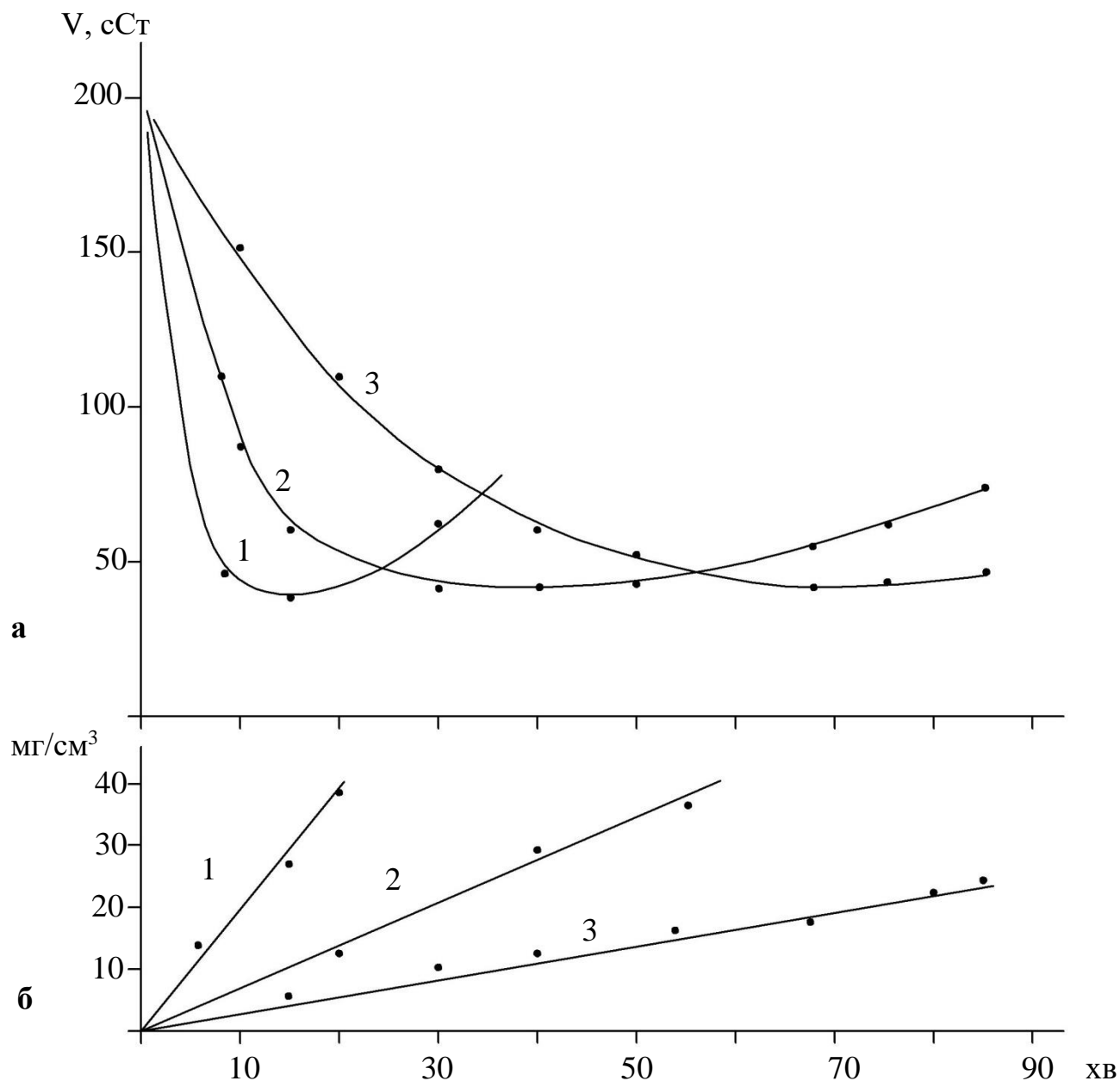


Рисунок 43 – а) Залежність кінематичної в'язкості 20 %-го розчину казеїнів від тривалості дії протеолітичного препарату реніномукорину (35 °С, рН 6,7).

Концентрація ферментного препарату: 1 – 0,2 %; 2 – 0,1 % і 3 – 0,05 %.

б) Концентрація продуктів протеолізу казеїну, розчинних в 12 %-й ТХО на різних етапах дії реніномукорину на 20 %-й розчин казеїну. Концентрація ферментного препарату: 1 – 0,2 %; 2 – 0,1 % і 3 – 0,05 %

Для уточнення специфіки протеолізу були проведенні електрофоретичні дослідження складу казеїнів на різних етапах протеолізу (рис. 44). На електрофореграмі видно характерне розділення білків казеїнового комплексу до дії протеолітичного препарату (рис. 44.1). Далі, після початку протеолізу реніномукорином відбувається розщеплення фракції κ -CN і появляються продукти її розщеплення з низькою електрофоретичною рухливістю (рис. 44.2). Розпад κ -казеїну співпадає в часі з досягненням мінімального значення в'язкості (~15 хв). Подальший розпад α _S- і β -казеїнів не впливає суттєво на в'язкість казеїнового розчину.

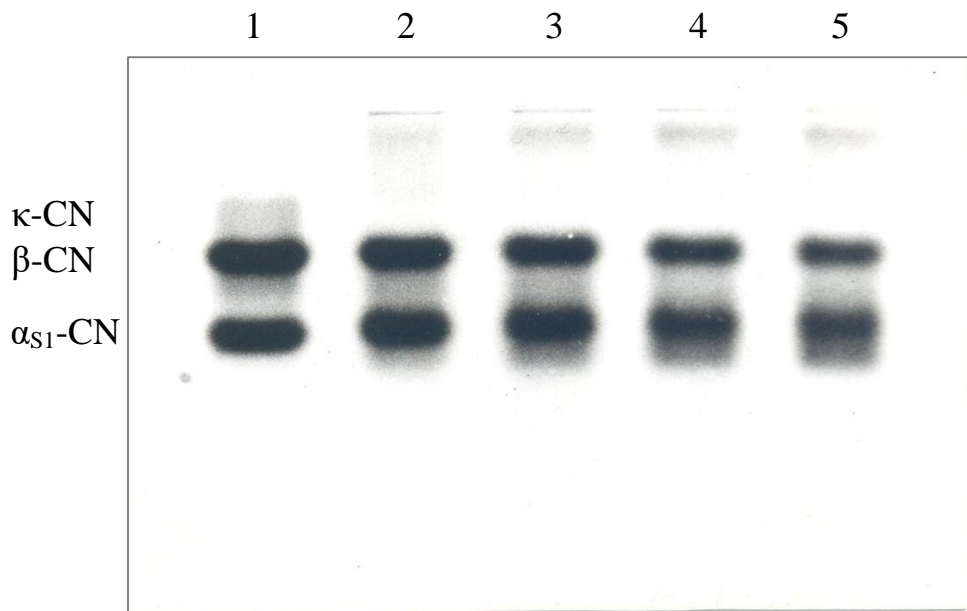


Рисунок 44 – Електрофореграма 20 %-го казеїнового розчину (1) та цього ж розчину через 15 (2), 30 (3), 45 (4) і 60 (5) хв дії 0,1 %-го протеолітичного ферментного препарату реніномукорину (В. Юкало, 1984)

Зміни на рівні казеїнових міцел ілюструє електронна мікроскопія (рис. 45). На фотографіях видно, що початковий розчин казеїну складається з міцел різної величини з середнім масовим діаметром близько 93 нм (рис. 45.1). Після досягнення мінімального значення в'язкості розміри міцел змінюються і вони стають більш однорідними (середній масовий діаметр становить ~ 35 нм.). У відповідності до субміцелярної теорії казеїнові міцели складаються із

субміцел, які зв'язані між собою через кальційфосфат. Субміцели мають діаметр близько 20 нм і включають 10-12 білкових субодиниць казеїну.

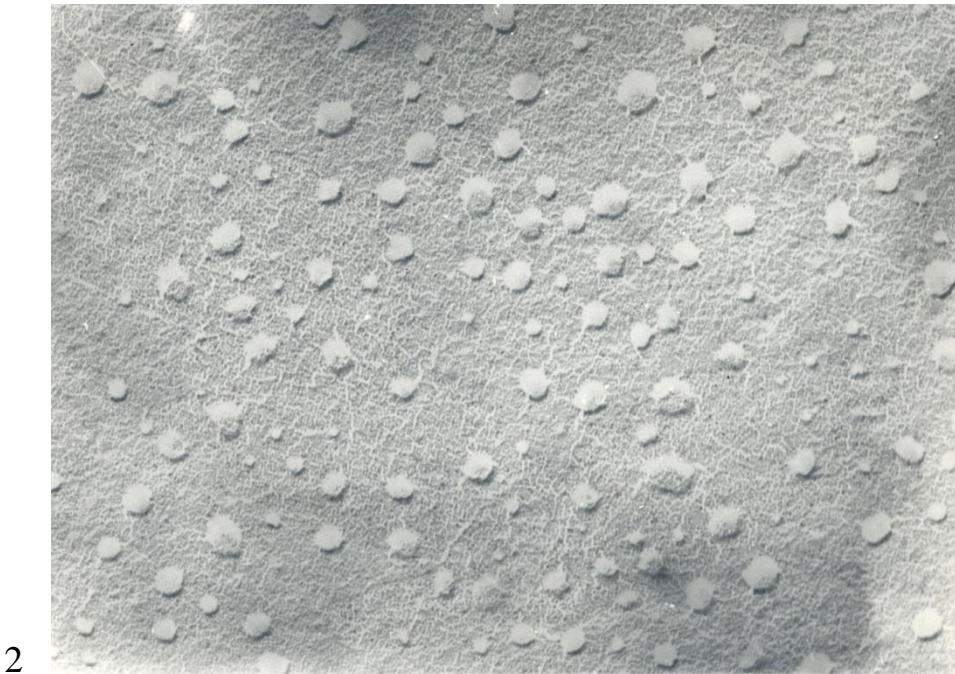


Рисунок 45 – Фотографії 20 %-го розчину казеїну (1) і цього ж розчину у момент досягнення мінімуму в'язкості (2) під дією реніномукорину (15 хв протеолізу). Загальне збільшення $31000 \times 1,5$ (В. Юкало, 1984)

На поверхні субміцели розміщені κ -казеїн і гідрофільні ділянки α_{S1} - і β -казеїнів, які приймають участь у міжсубміцелярних зв'язках. Всередині субміцела гідрофобна. Очевидно, що початковий протеоліз доступних до дії ферментів білків оболонки субміцел (це в основному κ -казеїни) призводить до дезагрегації міцел, розриву зв'язків між субміцелами (рис. 46). Це спричиняє зниження в'язкості. Подальший протеоліз білків гідрофільної оболонки субміцел може привести до розвитку гідрофобних взаємодій між субміцелами, їх агрегацій і утворення згустку казеїну. У певній мірі подібний процес відбувається в молоці при протеолізі казеїну сичужним ферментом.

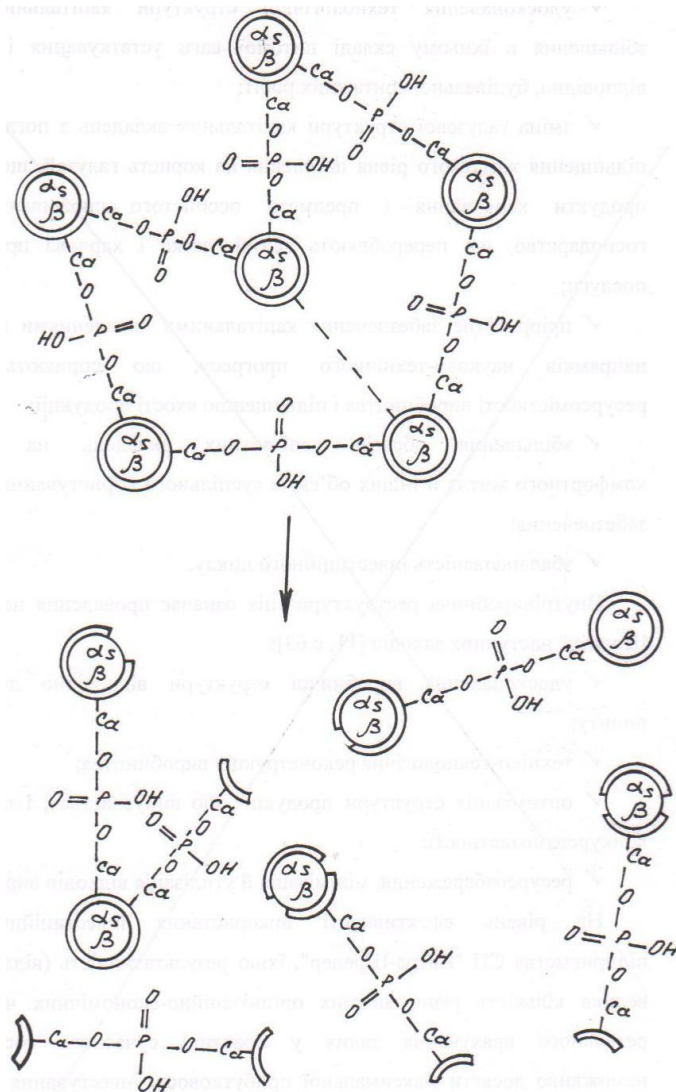


Рисунок 46 – Схематичне представлення дезагрегації казеїнової міцели під дією протеолітичного препарату (В. Юкало, 1984)

9.3.1. Визначення зміни в'язкості казеїнового розчину за дії протеолітичного препарату

Метод зниження в'язкості казеїнових розчинів базується на дезінтеграції казеїнових міцел в результаті обмеженого протеолізу білків казеїнового комплексу.

Матеріали, реактиви і обладнання

Казеїн сухий харчовий, протеолітичний ферментний препарат, розчин гідроксиду натрію $0,15 \text{ моль/дм}^3$, віскозиметр капілярний ВПЖ-1 (рис. 47), ультратермостат водяний, рН-метр, термометр, колби конічні (100 і 200 см^3), мірні колби на 100 см^3 , піпетки на 1, 2, 5 і 10 см^3 , циліндри (50 і 100 см^3), ваги технічні 4-го класу точності.

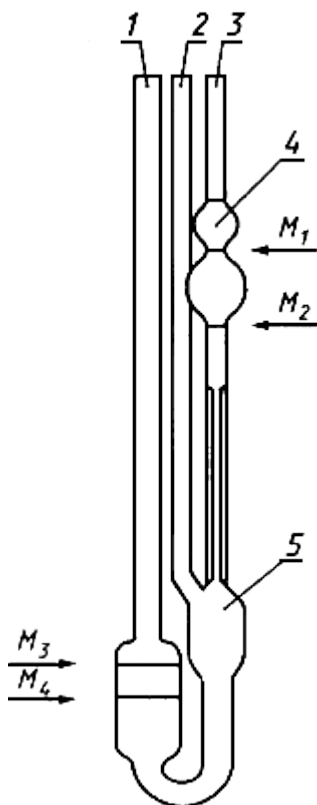


Рисунок 47 – Віскозиметр ВПЖ-1

Хід визначення

Для приготування 20 %-го розчину казеїну в суху конічну колбу (200 см³) вносять 30 г казеїну і 115 см³ 0,15 моль/дм³ розчину гідроксиду натрію. Суміш перемішують при нагріванні до повного розчинення казеїну. Відбирають з отриманого розчину 29 см³, додають 1 см³ дистильованої води і ретельно перемішують. Цей 20 %-й розчин казеїну (30 см³) використовують для вимірювання в'язкості як початковий (без ферментного препарату). Залишок розчину казеїну (116 см³) термостатують 30 хв при 35 °С і додають до нього 4 см³ розчину ферментного препарату. Ферментний препарат готують, розчиняючи 60 мг препарату в 4 см³ дистильованої води. Використана кількість препарату забезпечує співвідношення фермент:субстрат як 1:200. Далі через 15, 30 і 45 хв відбирають приблизно по 30 см³ розчину гідролізованого казеїну для вимірювання в'язкості. В'язкість вимірюють на капілярному віскозиметрі ВПЖ-1. Вимірювання проводять при температурі 65 °С. Саме така температура використовується при виготовленні деяких комбінованих харчових продуктів з казеїном. Температура у віскозиметрі підтримується з допомогою водяного ультратермостату з насосом і спеціальної ємкості з органічного скла, в якій віскозиметр фіксується у строго вертикальному положенні.

Кінематичну в'язкість в м²/с обчислюють за формулою:

$$v = \frac{g}{980,7} \cdot T \cdot K,$$

де v – кінематична в'язкість, м²/с;

K – постійна віскозиметра; м²/с;

T – тривалість витікання розчину казеїну, с;

g – прискорення вільного падіння в місці виміру, м/с².

Як кінцеве використовують середнє значення двох вимірів для кожного інтервалу. Результати оформляють у вигляді графіку залежності кінематичної в'язкості від тривалості протеолізу.

Запитання для самоконтролю

1. Які групи протеаз беруть участь у протеолітичних процесах в молоці і молочних продуктах?
2. Як відбувається зсідання молока за дії ферментних молокозсідальних препаратів?
3. Які протеолітичні процеси можуть призвести до утворення біологічно активних пептидів у молоці і молочних продуктах?
4. Якими показниками характеризуються молокозсідальні препарати?
5. Опишіть методику визначення молокозсідальної активності.
6. Як визначити протеолітичну активність молокозсідальних препаратів?
7. Опишіть послідовність операцій при визначенні специфічності протеолітичної дії молокозсідальних препаратів.
8. Дайте характеристику натурального карпатського молокозсідального препарату «Глек».
9. Які ферменти входять до складу протеолітичних систем молочнокислих бактерій?
10. Як визначають протеолітичну активність молочнокислих бактерій?
11. Які функціональні властивості білків молока регулюють з використанням протеолітичних ферментів?
12. Які зміни відбуваються з білками казеїнового комплексу молока під час регуляції в'язкості їх розчинів протеолітичними ферментами?
13. Опишіть методику визначення зміни в'язкості казеїнового розчину за дії протеолітичного препарату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Горбатова К.К. Химия и физика молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова, П.И. Гунькова. – СПб. : ГИОРД, 2012. – 336 с.
2. ГОСТ 3626-73. Молоко и молочные продукты. Методы определения влаги и сухого вещества. – Введ. 01.07.74. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – С. 218 – 219. Группа Н 19.
3. ГОСТ 23327-98. Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка. – Введ. 01.01.2000. Группа Н 19.
4. ГОСТ 25179-90. Молоко. Методы определения белка. – Введ. 01.01.91. – М. : ИПК Изд-во стандартов. 1996. – С. 273 – 280. Группа Н 19.
5. ГОСТ 5867-90. Молоко и молочные продукты. Методы определения жира. – Введ. 01.07.93. – М. : ИПК Изд-во стандартов, 1998. – С. 254 – 261. Группа Н 19.
6. ДСТУ 6066:2008. Молоко та молочні продукти. Методики визначення температури і маси нетто. – Надано чинності 31.12.2008. –Київ : Держспоживстандарт України, 2008. – 7 с.
7. ДСТУ 6082:2009. Молоко та молочні продукти. Методи визначення густини. – Надано чинності 20.01.2009. – Київ : Держспоживстандарт України, 2009. – 15 с.
8. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – Введ. 01.01.94. – М. : ИПК Изд-во стандартов, 1996. – С. 35 – 45. Группа Н 19.
9. ГОСТ 26781-85 Молоко. Метод измерения рН. – Введ. 01.12.86. – М. : ИПК Изд-во стандартов, 1998. – С. 290 – 293. Группа Н 19.
10. ДСТУ ISO 1211:2002 Молоко. Гравіметричний метод визначення вмісту жиру (контрольний метод). – Надано чинності 18.09.2002. – Київ : Держспоживстандарт України, 2004. – С. 41 – 56.

- 11.Залашко М.В. Исследование протеолитической активности молочнокислых бактерий / М.В. Залашко, Н.В. Образцова, Е.И. Савченко // Физиология и биохимия микроорганизмов. – Минск : Наука и техника, 1970. – С. 121 – 128.
- 12.Крусь Г.И. Методы исследования молока и молочных продуктов / Г.Н. Крусь, А.М. Шалыгина, З.В. Волокитина. Под общ. ред. А.М. Шалыгиной. – М. : Колос, 2000. – 368 с.
- 13.Ленинджер А. Основы биохимии: Т. 3. Пер. с англ. / А. Ленинджер – М. : Мир, 1985. – 350 с.
- 14.Охрименко О.В. Лабораторный практикум по химии и физике молока / О.В. Охрименко, К.К. Горбатова, А.В. Охрименко. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 256 с.
- 15.Рудавская А.Б. Химико-товароведная характеристика гуцульской брынзы и биохимические процессы, протекающие в ней при созревании и хранении : дис. на соискание учен. степени кандидата техн. наук / Анна Богдановна Рудавская; Львовский торгово-экономический институт. – Львов, 1955. – 144 с.
- 16.Стандарт ФРН ДИН 10344-82. Молоко и молочные продукты. Метод определения галактозы. – Введ. 01.01.2000. – М. : Стандартиформ, 2009. Группа Н 19.
- 17.Столяр, О.Б. Біологічна хімія : навч. посібн. / О.Б. Столяр. – Тернопіль : Підручники і посібники, 2014. – 368 с.
- 18.Тепел А. Химия и физика молока / А. Тепел. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 624 с.
- 19.Теплы М. Молокосвертывающие ферменты животного и микробного происхождения / М. Теплы, Я. Машек, Я. Гавлова. – М. : Пищевая промышленность, 1980. – 272 с.

20. Чагаровський О.П. Хімія молочної сировини : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / О.П. Чагаровський, Н.А. Ткаченко, Т.А. Лисогор. – Одеса : «Сімекс-прінт», 2013. – 268 с.
21. Юкало А.В. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А.В. Юкало, Л.А. Сторож, В.Г. Юкало // Біотехнологія. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 21 – 33.
22. Юкало А.В. Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока корів (*BosTaurus*) / А.В. Юкало, К.Є. Дацишин, В.Г. Юкало // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т. 6, № 5. – С. 49 – 61.
23. Юкало В.Г. Влияние ренниномокурина и некоторых поверхностно активных веществ на вязкость казеиновых растворов : дис. на соискание учен. степени кандидата хим. наук / Владимир Глебович Юкало; ИНЭОС АН СССР. – Москва, 1984.
24. Юкало В.Г. Білки казеїнового комплексу коров'ячого молока та продукти їх протеолізу за дії ферментів молочнокислих бактерій : дис. на здоб. вченого ступеня доктора біол. наук : 03.00.04 / Володимир Глібович Юкало; ІБТ ААНУ. – Львів, 2007. – 359 с.
25. Basch J.J. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with harland-ashworth procedure / J.J. Basch, F.W. Douglas, L.G Procino et. al // *J. Dairy Sci.* – 1985. – V. 68, № 1. – P. 23 – 31.
26. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein / B.J. Davis // *Ann N Y Acad Sci.* – 1964. – V. 121. – P. 404 – 427.
27. Farrell H.M. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision / H.M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck // *J. Dairy Sci.* – 2004. – V. 87, № 6. – P. 1641 – 1674.
28. Fox P.F. Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Editon) / P.F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P.L.H. McSweeney, J.A. O'Mahony. – New York: Springer, 2015. – 585 p.

29. Gaucheron F. Milk Salts: Distribution and analysis. In: John W. Fuquay, Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney. Encyclopedia of dairy sciences (2 nd ed.). – Academic Press, Oxford, UK, 2011. – P. 908 – 916.
30. Handbook of Dairy Foods Analysis / Edited by Leo M.L. Nollet, Filed Toldra. – Boca Raton : CRC Press, 2010. – 918 p.
31. Holt C. Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods / C. Holt, J.A. Carver, H. Ecroyd, D.C. Thorn // Journal of Dairy Science. – 2014. – V. 96 – P. 6127 – 6146.
32. Iukalo A.V. Milk-coagulation and proteolytic activity of «Glek» – Carpathian enzyme preparation / A.V. Iukalo // Biotechnologia Acta. – 2015. – V. 8, № 2. – P. 91 – 95.
33. Schmidt D.G. Association of caseins and casein micelle structure. In: P.F. Fox (ed.). Developments in Dairy Chemistry, Vol. 1. Protein. – London: Elsevier Applied Science, 1982. – Pp. 61 – 86.
34. Swaisgood H.E. Chemistry of the casein. In: P.F. Fox, McSweeney (ed.). Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1: Proteins (3 rd. ed., Part A.) – New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 139 – 201.

ЗМІСТ

Вступ	3
1. Лабораторна робота № 1. ВИЗНАЧЕННЯ МАСОВОЇ ЧАСТКИ ВОДИ ТА СУХИХ РЕЧОВИН У МОЛОЦІ ТА МОЛОЧНИХ ПРОДУКТАХ.....	4
1.1. Арбітражний метод визначення сухої речовини і вологи у молоці і молочних продуктах (на основі ГОСТ 3626-73).....	5
1.2. Прискорений метод визначення сухої речовини у пастеризованому і стерилізованому молоці та в кисломолочних напоях (на основі ГОСТ 3626-73).....	7
1.3. Прискорений метод визначення вологи і сухої речовини у сирах, кисломолочному сирі, і сиркових виробках (на основі ГОСТ 3626-73).....	8
1.4. Визначення сухого залишку і сухого знежиреного залишку у молоці і молочних продуктах розрахунковим методом.....	11
2. Лабораторна робота № 2. БІЛКИ МОЛОКА.....	14
2.1. Метод визначення масової частки загального азоту і білків за К'ельдалем (на основі ГОСТ 23327-98).....	15
2.2. Визначення білка молока колориметричним методом (на основі ГОСТ 25179-90).....	20
2.3. Визначення масової частки білку в молоці методом формольного титрування (на основі ГОСТ 25179-90).....	22
2.4. Визначення концентрації білків молока спектро-фотометричним методом.....	25
2.5. Виділення основних груп білків з молока.....	26
3. Лабораторна робота № 3. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІЛКІВ МОЛОКА.....	32

3.1. Електрофорез білків казеїнового комплексу молока (за В. Юкалом, 2007).....	33
3.2. Електрофорез білків сироватки молока (за Б. Девісом у модифікації В. Юкала, 2007).....	37
4. Лабораторна робота № 4. ГЕЛЬ-ФІЛЬТРАЦІЯ БІЛКІВ МОЛОКА, МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ І КАЗЕЇНОВОГО КОМПЛЕКСУ.....	43
4.1. Гель-фільтрація білків молока.....	44
4.2. Гель-фільтрація білків сироватки молока.....	47
4.3. Гель-фільтрація білків казеїнового комплексу.....	50
5. Лабораторна робота № 5. ВУГЛЕВОДИ МОЛОКА.....	53
5.1. Визначення масової частки лактози в молоці йодометричним методом (за Г. Крусь, 2002).....	57
5.2. Визначення масової частки лактози в молоці рефрактометричним методом (за О. Охріменко, К. Горбатовою, А. Охріменко, 2005).....	60
5.3. Ферментативний метод визначення лактози в молоці (на основі стандарту ФРН DIN 10344 – 82).....	63
6. Лабораторна робота № 6. ЛІПІДИ МОЛОКА.....	68
6.1. Визначення масової частки жиру в молоці і молочних продуктах кислотним методом (на основі ГОСТ 5867-90).....	74
6.2. Визначення масової частки жиру в молоці гравіметричним методом (на основі ДСТУ ISO 1211:2002).....	82
7. Лабораторна робота № 7. МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ І ВІТАМІНИ МОЛОКА.....	87
7.1. Макро- і мікроелементи молока.....	87

7.1.1. Визначення масової частки кальцію в молоці комплексонометричним методом (За О. Охріменко, К. Горбатовою і А. Охріменко, 2005).....	96
7.1.2. Визначення масової частки хлоридів в молоці (За О. Охріменко, К. Горбатовою і А. Охріменко, 2005).....	97
7.2. Вітаміни молока.....	100
7.2.1. Визначення вітаміну С в молоці (за О. Охріменко, К. Горбатовою, А. Охріменко, 2005).....	103
8. Лабораторна робота № 8. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОЛОКА.....	105
8.1. Визначення температури молока (на основі ДСТУ 6066:2008).....	109
8.2. Визначення густини молока (на основі ДСТУ 6082:2009).....	110
8.3. Визначення кислотності молока.....	119
8.3.1. Титрометричне визначення кислотності молока (на основі ГОСТ 3624-92).....	121
8.3.2. Визначення граничної кислотності молока (на основі ГОСТ 3624-92).....	122
8.3.3. Визначення активної кислотності молока (на основі ГОСТ 26781-85).....	123
8.4. Визначення в'язкості молока (за О. Охріменко, К. Горбатовою, А. Охріменко, 2005).....	125
9. Лабораторна робота № 9. ПРОТЕОЛІТИЧНІ ПРОЦЕСИ В МОЛОЦІ І МОЛОЧНИХ ПРОДУКТАХ.....	131
9.1. Характеристика активності і специфічності дії молокозсідальних препаратів.....	136

9.1.1. Вивчення молокозсідальної активності.....	139
9.1.2. Визначення протеолітичної активності.....	141
9.1.3. Визначення специфічності протеолітичної дії молокозсідальних препаратів	145
9.2. Характеристика активності протеолітичних систем молочнокислих бактерій.....	152
9.2.1. Визначення загальної протеолітичної активності молочнокислих бактерій методом М. Гула в модифікації М. Залашка.....	155
9.3. Регуляція в'язкості казеїнових розчинів протеолітичними ферментними препаратами (за В. Юкало, 1984).....	157
9.3.1. Визначення зміни в'язкості казеїнового розчину на дії протеолітичного препарату.....	162
Література.....	163

Навчально-методична література

ЮКАЛО Володимир Глібович

Лабораторний практикум з хімії та фізики молока і молочних продуктів

Навчальний посібник

Комп'ютерне макетування та верстка *А.П. Катрич*

Формат 60x90/16. Обл. вид. арк. 5,75. Тираж 300 прим.

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя
46001, м. Тернопіль, вул. Руська, 56.

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4226 від 08.12.11.