

УДК 664, 648, 18, 579

Т. Ю. Гумеров, Р. Р. Мустафин, Э. Ф. Хабибуллина,
О. А. Решетник

ОПТИМИЗАЦИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА В КОЛИЧЕСТВЕННОМ АНАЛИЗЕ СУММЫ СВОБОДНЫХ α -АМИНОКИСЛОТ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ

Ключевые слова: спектрофотометрия, аминокислоты, зерновое сырье.

Общественное питание является важным структурным элементом социальной инфраструктуры, роль общественного питания достаточно значима и направлена на выполнение главной функции - создание комплекса условий для развития экономики и обеспечения нормальной жизнедеятельности человека.

Keywords: spectrophotometry, amino acids, grain raw material

Food is an important structural element of the social infrastructure, the role of public power is significant enough and is aimed at the main function - the creation of a set of conditions for economic development and maintenance of normal human life.

Введение

Производство зерна является одной из важнейших характеристик продовольственной безопасности страны и ее регионов. Качество зерна как объекта хранения и переработки зависит от его видовых и сортовых особенностей, а также от условий развития растения в поле.

Зерно и его потенциальные технологические свойства формируются в процессе развития под влиянием многочисленных факторов. Сформировавшиеся свойства зерна оказывают определяющее влияние на многие процессы его послеуборочной обработки, хранения и переработки, но зачастую и сами изменяются в результате этих процессов.

Все вещества, входящие в состав зерна, делят на органические (углеводы, белки, липиды, пигменты, ферменты, витамины) и неорганические (вода, минеральные элементы). Все злаковые по химическому составу относятся к группе крахмалистого растительного сырья, так как в них количественно преобладает крахмал, зернобобовые – к группе белковых, так как в них преобладают белки, масличные в основном содержат липиды [1, 2].

Наиболее биологически ценной составляющей частью плодов и семян является белок. Именно белковые фракции определяют их пищевую товарную ценность. Из злаковых – белками наиболее богато зерно пшеницы, наименее – зерно риса. Полноценные белки содержат все незаменимые аминокислоты *аргинин, валин (норвалин), гистидин, лейцин (изолейцин), лизин, метионин, триптофан, треонин, фенилаланин*. Наибольшую биологическую ценность с учетом аминокислотного состава их белков представляет зерно риса, овса, гречихи. Неполноценными считаются белки проса и кукурузы. В состав зерна входят и небелковые азотистые вещества (аминокислоты, амины, алкалоиды). Их повышенное содержание свидетельствует или о незавершенных процессах созревания, или о порче зерна.

Химический состав зерна постоянно изменяется. Изменения проявляют себя с момента высева

семян в поле, в период роста и развития растения, при созревании, уборке, хранении и переработке зерна на предприятиях (мукомольных, крупяных, крахмалопаточных и др.).

Состояние, качество и технологические особенности зерна определяются тремя факторами: генетическим, внешними условиями и совокупностью воздействий, оказываемых на зерно на всех этапах работы с ним. Интенсивная технология, применяемая в сельском хозяйстве, приближает к оптимальным условия развития и созревания зерна и в итоге улучшает его качество [3, 4].

Целью работы являлось адаптировать спектрофотометрический метод для количественного определения α -аминокислот в зерновом сырье на основе исследования спектральных характеристик продуктов нингидроновой реакции. Кроме того, оптимизировать условия проведения биохимических исследований водных экстрактов образцов [5].

Исходя из цели, были сформулированы следующие задачи:

- адаптировать метод спектрофотометрии для количественного анализа аминокислот;
- изучить спектральные характеристики в видимой и УФ – области оптической плотности водных растворов экстрактов зернового сырья;
- оптимизировать условия проведения кислотного гидролиза экстрактов образцов с целью повышения выхода суммы α -аминокислот из зернового сырья;
- изучить влияние продолжительности гидролиза на выход суммы α -аминокислот;
- изучить влияние балластных веществ на содержание суммы α -аминокислот в зерновом сырье после гидролиза (в оптимизированных условиях).

На начальном этапе эксперимента проводились исследования спектральных характеристик продуктов реакции α -аминокислот с 0,2% раствором нингидрина в воде [6].

В качестве исследуемых образцов было подобрано зерновое сырье, выращенное в различных

районах Республики Татарстан. Данные исследования проводились с целью выявления наиболее ценного зернового сырья в зависимости от географического места расположения, климатических условиях и метеорологических особенностях выращивания зерна. В работе рассмотрены 10 образцов со следующим обозначением: О-1; О-2; О-3; О-4; О-5; О-6; О-7; О-8; О-9 и О-10. Каждый образец отличается генетическими особенностями зерна, влиянием внешних условий при выращивании, (условия возделывания, дозы и соотношение удобрений, применение различных препаратов, условия, влияющие в значительной степени на биохимический состав), формой, цветом, размером и периодом созревания.

Изучение спектральных характеристик проводилось на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ в лаборатории биохимического анализа кафедры ТПП КНИТУ. Зерновое сырье подверглось экстрагированию с получением водной эмульсии [6].

В результате исследования водных растворов образцов на спектрофотометре, были получены следующие результаты в виде спектров поглощения оптической плотности (табл. 1 и 2).

Таблица 1 - Спектры поглощения оптической плотности

λ , нм	Образцы				
	О-1	О-2	О-3	О-4	О-5
340	1,3	1,308	1,266	1,257	1,213
380	1,623	1,794	1,634	1,688	1,313
400	1,827	1,972	1,887	1,891	1,325
440	0,827	1,27	0,664	1,075	0,471
480	0,721	1,165	0,632	0,995	0,385
520	1,106	1,847	1,023	1,393	0,578
540	1,439	2,038	1,646	1,699	0,782
560	1,581	2,023	1,287	1,791	0,875
580	1,521	1,97	1,721	1,722	0,826
600	1,289	2,077	1,513	1,588	0,675
620	0,955	1,833	1,078	1,252	0,481
640	0,664	1,289	0,656	0,934	0,313
660	0,442	0,797	0,408	0,713	0,201
680	0,332	0,53	0,24	0,562	0,14
700	0,269	0,393	0,17	0,495	0,116
760	0,206	0,268	0,106	0,424	0,082

По результатам таблиц можно наблюдать наличие двух максимумов в диапазонах длин волн 380-400 и 560-580 нм, то есть спектры поглощения в видимой области. Данная закономерность наблюдается для всех 10 исследуемых образцов и объясняется это наличием первичных аминокислот α -аминокислот в структуре зернового сырья.

В работе также исследована УФ- область спектра продуктов реакции экстрактов зернового сырья с 0,2 % раствором нингидрина в воде, где установлено, что все образцы имеют два максимума поглощения в диапазонах длин волн 220-240 и 250-260 нм (рис.1).

В результате эксперимента установлено, что для всех исследуемых образцов зерновых культур характерны четыре максимума поглощения, два из

которых находятся в УФ-области, в интервале 220-240 и 250-260 нм, и два в видимой области, в диапазоне 380-400 и 560-580 нм.

Таблица 2 - Спектры поглощения оптической плотности

λ , нм	Образцы				
	О-6	О-7	О-8	О-9	О-10
340	1,193	1,237	1,271	1,317	1,295
380	1,443	0,571	1,514	1,624	1,777
400	1,623	0,648	1,622	1,647	1,942
440	0,677	1,160	0,790	0,627	0,855
480	0,593	1,016	0,691	0,474	0,704
520	0,913	1,100	0,940	0,705	1,247
540	1,183	1,208	1,111	0,935	1,624
560	1,322	1,236	1,227	1,055	1,759
580	1,262	1,178	1,187	1,014	1,668
600	1,071	1,064	1,005	0,802	1,451
620	0,785	0,905	0,762	0,572	1,042
640	0,539	0,756	0,549	0,364	0,645
660	0,372	0,661	0,421	0,220	0,375
680	0,281	0,591	0,348	0,144	0,238
700	0,235	0,547	0,303	0,101	0,159
760	0,186	0,469	0,246	0,066	0,094

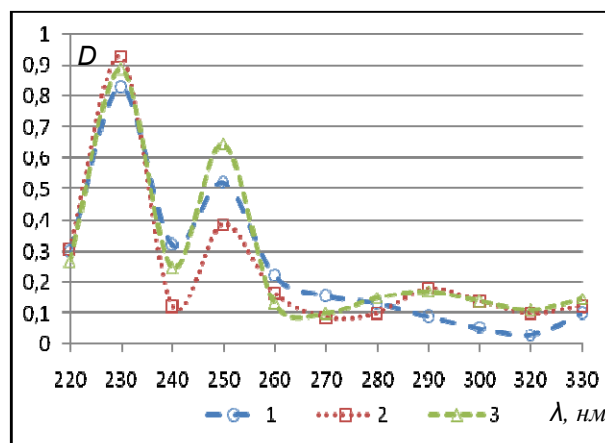


Рис. 1 - УФ область спектра продуктов взаимодействия экстракта зерновых культур с 0,2% раствором нингидрина в воде: где D – оптическая плотность, λ – длина волны, нм

Таблица 3 - Характеристика спектров поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2% раствором нингидрина

№ п/п	Образец	Максимум поглощения, нм	
		Видимая область	УФ-область
1	О-1	400,568	230,256
2	О-2	400,566	230,254
3	О-3	400,478	230,258
4	О-4	399,569	230,257
5	О-5	400,534	230,343
6	О-6	400,657	230,255
7	О-7	400,654	230,256
8	О-8	400,561	230,314
9	О-9	400,789	230,332
10	О-10	400,498	230,378

Таким образом, большинство продуктов реакции α -аминокислот с раствором нингидрина в воде характеризуется единым максимумом поглощения при длине волны 400 нм, что обуславливает целесообразность использования данной длины волны в качестве аналитической [6].

Для качественного и количественного анализа α -аминокислот в зерновых продуктах в работе целесообразно исследовать спектральные характеристики 0,2% водного раствора нингидрина после его нагревания при температуре 100°C в течении 15 мин. В работе [6] установлено, что водный раствор нингидрина имеет интенсивное поглощение в диапазоне длин волн 220-300 нм, но совершенно не поглощает в диапазоне длин волн от 400 до 600 нм. Поэтому целесообразно проводить спектрофотометрические исследования продуктов реакции с 0,2 % водным раствором нингидрина в видимой области спектра в диапазоне длин волн от 380 до 600 нм.

Далее в работе было определено количественное содержание аминокислот в исследуемых образцах, в соответствие с методикой [6]. Данная реакция впервые была открыта Руманом. Позднее установлено, что нингидрин специфичен к алифатическим или алициклическим первичным аминокруппам. Вторичные, третичные и четвертичные амины, амиды и amino-замещенные ароматические соединения дают слабую реакцию или не дают вовсе. Исключение – пролин, который образует с нингидрином окраску желтого цвета, как считают некоторые исследователи, благодаря раскрытию цикла.

Свободные α -аминокислоты дают синевioletовое окрашивание с нингидрином. На первой стадии реакции α -аминокислот с нингидрином образуются углерода диоксид, альдегид и устойчивое промежуточное соединение – 2-аминоиндандион, участвующий в двух параллельных реакциях. В одной из них он реагирует с нингидрином до образования 2-гидроксииндандиона и 2-иминоиндандиона, которые, конденсируясь между собой, формируют дикетогидринденкетогидринамин. Во второй реакции 2-аминоиндандион в кислой среде подвергается гидролизу до аммиака и 2-гидроксииндандиона, последний, взаимодействуя с нингидрином, образует гидриндантин [7].

После проведения нингидриновой реакции, полученные цветные растворы образцов подвергались определению оптимальных значений оптических плотностей.

В водном извлечении зернового сырья аминокислоты содержатся как в свободном, так и в связанном состоянии (в составе пептидов и белков). С целью повышения выхода суммы аминокислот из зернового экстракта в работе были оптимизированы условия проведения кислотного гидролиза.

В качестве гидролизующего агента был использован раствор хлороводородной кислоты, обеспечивающий достаточно полное расщепление белков и пептидов водного экстракта до α -аминокислот. Кроме того, получаемые гидролизаты характеризуются высокой стабильностью, уменьшается вероятность их микробной контаминации, что

является важным фактором при подготовке образцов к анализу [8].

Следует отметить, что несмотря на высокий выход α -аминокислот, проведение кислотного гидролиза в данных условиях связано с воздействием повышенного давления на сырье, сложным аппаратным оформлением процесса, а также со значительными временными затратами при подготовке гидролизата (более 20 ч), что ограничивает использование данной технологии в условиях промышленного производства. На этом основании целью эксперимента являлось оптимизировать условия кислотного гидролиза для повышения выхода аминокислот из сырья и разработать доступную методику. К 5 г зернового сырья добавляли 35 мл воды и оставляли на 30 мин. Далее к сырью добавляли 65 мл. раствора хлороводородной кислоты в концентрации от 0,5М до 5М и проводили гидролиз при температуре 80-90 °C в течении 2ч. Затем гидролизат отделяли фильтрованием, а сырье, для его более полного истощения, четырехкратно экстрагировали водой (в соотношении 1:6) по 30 мин в аналогичном температурном режиме. Полученные извлечения фильтровали и объединяли с гидролизатом.

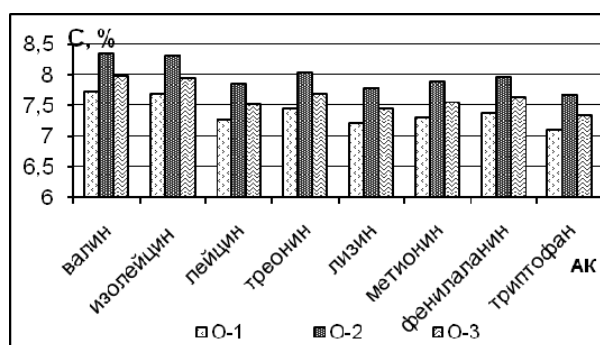
К объединенному гидролизату добавляли натрий гидрокарбонат до нейтральной реакции, переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили водой до метки. В результате кислотного гидролиза образуется комплекс балластных веществ (в том числе и продукты частичного гидролиза ВМС), снижающих качество готового продукта. Для очистки от данных веществ, к 25 мл гидролизата добавляли трехкратный объем 96% этанола и оставляли в течение 10-12 ч при температуре 3-4 °C. Образующийся осадок отделяли центрифугированием, после чего извлечение сгущали до полного удаления этанола, переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили водой до метки.

Далее проводилась нингидриновая реакция. Установлено, что гидролиз зернового сырья 1 М раствором хлороводородной кислоты обеспечивает наиболее высокий выход суммы аминокислот – до 94,0% в пересчете на конкретную аминокислоту (рис.2).

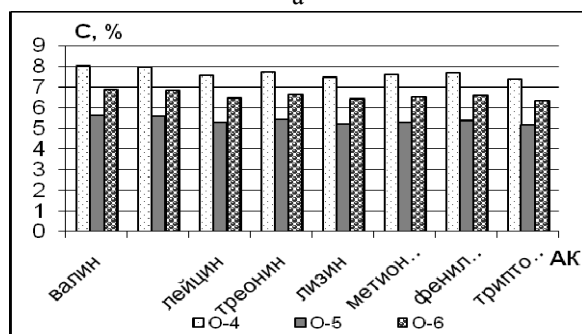
Как видно из рисунков, количественное содержание незаменимых α -аминокислот в образцах незначительно варьирует, наиболее обогащенными можно выделить образцы О-2, О-4, и О-10, в которых количество незаменимых аминокислот на 20-30% превышает остальные.

Образец О-5 характеризуется наименьшими количественными характеристиками по всем незаменимым аминокислотам.

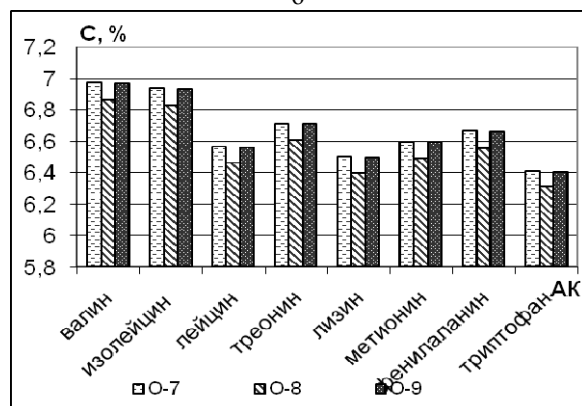
Анализ количественного содержания заменимых аминокислот показал следующие результаты: образцы О-1, О-2, О-4 и О-10 характеризуются наибольшим количественным содержанием заменимых аминокислот (8,91%, 9,623%, 9,228% и 9,487%), а образец О-5 с наименьшим (6,47%).



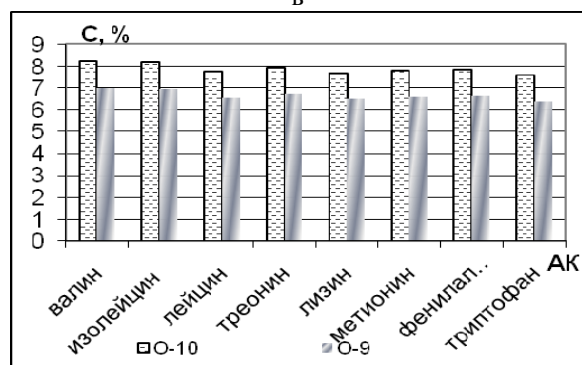
а



б



в



г

Рис. 2 - Количественное содержание незаменимых α -аминокислот в образцах: а) образцы О-1; О-2; О-3; б) образцы О-4; О-5; О-6; в) образцы О-7; О-8; г) образцы О-9; О-10

Данные результаты позволяют определить наиболее ценные сорта зернового сырья для использования в технологической линии производства отдельных видов сырья и продукции. Наиболее ценные по аминокислотному составу образцы рекомендуются использоваться для приготовления продукции диетического и функционального назначения, а

менее ценные образцы на производство кондитерских и макаронных изделий.

В следующей части эксперимента было изучено влияние продолжительности гидролиза на выход суммы аминокислот.

Таблица 4 – Влияние регулируемых факторов кислотного гидролиза на выход суммы α -аминокислот зернового сырья

№	Концентрация раствора HCl , М	Время гидролиза, ч	Выход суммы АК, %
1	0,5	1	77,2
		3	79,1
		6	80,4
		9	82,2
2	1,0	1	84,3
		3	87,1
		6	94,7
		9	91,6
3	1,5	1	88,4
		3	73,5
		6	74,2
		9	79,5
4	2,0	1	81,4
		3	82,1
		6	87,3
		9	67,1
5	2,5	1	85,8
		3	86,4
		6	86,3
		9	85,1
6	3,0	1	71,2
		3	76,3
		6	73,1
		9	72,8
7	3,5	1	67,4
		3	66,2
		6	65,3
		9	68,1
8	4,0	1	66,3
		3	68,5
		6	67,3
		9	65,1
9	5,0	1	58,2
		3	59,3
		6	57,4
		9	57,1

Кислотный гидролиз, 1 М HCl , проводился в интервале времени 1, 3, 6 и 9 часов. Установлено, что наибольший выход суммы аминокислот из зернового сырья наблюдается при продолжительности гидролиза в течение 6 часов. На нейтрализацию полученного извлечения израсходовано 5 г натрия гидрокарбоната.

Данные по оптимизации условий проведения кислотного гидролиза зернового сырья приведены в табл. 4.

Таким образом, в работе оптимизированы условия кислотного гидролиза: к 5 гр. зернового сырья

(точная навеска), высушенного до воздушно-сухого состояния, добавляли 35 мл воды дистиллированной и оставляли на 30 мин для набухания. Затем к набухшему сырью добавляли 65 мл 1 М раствора хлороводородной кислоты и проводили гидролиз при температуре 80-90 °С в интервале до 9 часов.

С целью изучения влияния балластных веществ на содержание суммы α -аминокислот в зерновом сырье после гидролиза (в оптимизированных условиях), были приготовлены кислотные гидролизаты без очистки от балластных веществ и с очисткой от балластных веществ с последующим проведением нингидриновой реакцией. Результаты представлены на примере незаменимой аминокислоты α -валин (рис. 3).

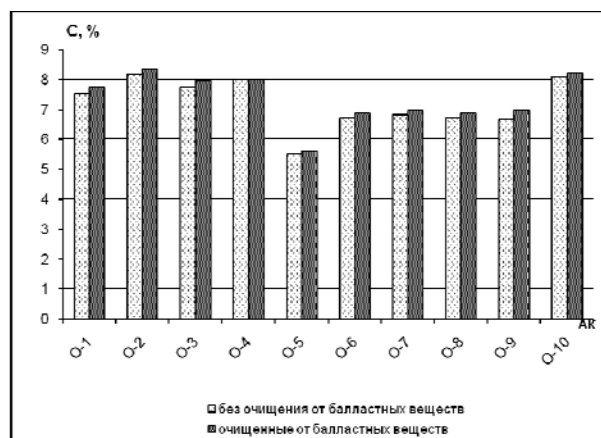


Рис. 3 - Содержание незаменимых аминокислот в образцах с центрифугированием и без

По результатам диаграмм (по всем незаменимым аминокислотам) видно, что образцы подвергнутые удалению балластных веществ методом центрифугирования характеризуются содержанием незаменимых аминокислот на 1,5-2,7 % больше чем в образцах без удаления балластных веществ. Так как исходное извлечение водного извлечения зернового сырья содержит вещества, реагирующие с нингидрином (а именно пептиды и белки), влияющие на изменение значений оптической плотности, может дать ошибку результатов количественного содержания α -аминокислот. Поэтому, для получения достоверных результатов, отражающих количественное содержание суммы α -аминокислот в растительном сырье, необходимо проводить доочистку от сопутствующих ВМС с помощью осаждения этанолом. Результате количественное содержание суммы α -аминокислот в исследуемых образцах представлены в таблице 5.

Статистическая обработка метода количественного определения суммы α -аминокислот в зерновом сырье характеризуется достаточно высокой точностью определения и воспроизводимостью. Относительная ошибка результатов определения для всех образцов не превышает $\pm 3\%$.

Таблица 5 – Суммарное содержание α -аминокислот в зерновом сырье

№ п/п	Образец	Содержание АК, %
1	O-1	14,8
2	O-2	10,06
3	O-3	15,32
4	O-4	15,35
5	O-5	10,76
6	O-6	13,18
7	O-7	13,38
8	O-8	13,17
9	O-9	13,38
10	O-10	15,76

В результате эксперимента были оптимизированы методы определения α -аминокислот в зерновом сырье, определены количественные характеристики незаменимых и заменимых аминокислот, а также определено их общее содержание с целью выявления образцов наиболее подходящих в технологии производства отдельных видов пищевого сырья [9, 10].

Выводы

В работе проведена адаптация и оптимизация спектрофотометрического метода в количественном анализе суммы свободных α -аминокислот зернового сырья. На основе исследования спектральных характеристик продуктов нингидриновой реакции подобраны условия проведения биохимических исследований водных экстрактов образцов.

- исследованы спектральные характеристики продуктов реакции α -аминокислот с 0,2% раствором нингидрина в видимой и УФ-области излучения;

- установлено, что, спектры поглощения в видимой области характеризуются наличием двух максимумов в диапазонах длин волн 380-400 и 560-580 нм, а также исследована УФ- область спектра поглощения продуктов реакции с 0,2 % раствором нингидрина, где установлено наличие двух максимумов в диапазонах длин волн 220-240 и 250-260 нм;

- определено, что большинство продуктов реакции α -аминокислот с раствором нингидрина в воде характеризуется единым максимумом поглощения при длине волны 400 нм, что обуславливает целесообразность использования данную длину волны в качестве основной аналитической;

- с целью повышения выхода суммы α -аминокислот из зернового экстракта были оптимизированы условия проведения кислотного гидролиза при использовании 1 М раствора хлороводородной кислоты;

- оптимизированные условия проведения кислотного гидролиза повысили выход α -аминокислот из сырья до максимального показателя 94,7 %;

- установлено, что наибольший выход суммы α -аминокислот из зернового сырья наблюдается при продолжительности гидролиза в течение 6 часов;

- определено, что удаление балластных веществ в образцах методом центрифугирования приводит к увеличению точности определения содержания незаменимых аминокислот на 1,5-2,7 %;

Литература

1. *Рогов, И. А.* Химия пищи: в 2 кн. Книга 1: Белки: структура, функции, роль в питании / И. А. Рогов, Л. В. Антипова, Н. И. Дунченко. – М.: Колос, 2000. – 384 с.
2. *Жеребцов, Н.А.* Биохимия / Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов. – Воронеж.: Издательство Воронежского университета, 2002 – 693 с.
3. *Матюхина, З.П.* Основы физиологии питания, гигиены и санитарии: учебник для нач. проф. образования: учеб. пособие для сред. проф. образования / З. П. Матюхина. – М.: Академия, 2004. – 184 с.
4. *Колпакова, В. В.* Химия пищевого белка: учеб. пособие / В. В. Колпакова, А. П. Нечаев. – М.: МГУ пищ. производств, 2003. – 87 с.
5. *Гумеров, Т.Ю.* Адаптация метода Рейхерта-Мейссля при изучении биохимического состава сырной продукции. / Т.Ю. Гумеров, О.А. Решетник // Вестник КГТУ. – №16.–2012.–199 с.
6. *Симомян, А.В.* Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах: методические рекомендации / А.В.Симомян, Ю.С. Саламатов, Ю.С. Покровская. – Волгоград, 2007. – 106 с.
7. *Гумеров, Т.Ю.* Роль природных адаптогенов при оценке качества напитков спортивного и функционального назначения. / Т.Ю. Гумеров, О.А. Решетник // Вестник КГТУ. – №18.–2013.–219 с.
8. *Pavek, J.J.* Positioning the Potato as a Primary Food Source of Vitamin C / J.J. Pavek, S.L. Lave // American Journal of Potato Research. – 2008. – Volume 85. – Number 4. – P. 277-285.
9. *Ауэрман, Л.Я.* Технология хлебопекарного производства / Л.Я. Ауэрман. – СПб.: Профессия, 2002. – 416 с.
10. *Могильный, М.П.* Роль функциональных свойств белков в специальных видах питания / Могильный М.П. // Известия вузов. Пищевая технология. – 2009. – №1 – С. 51-54.

© **Т. Ю. Гумеров** - канд. хим. наук, доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, tt-timofei@mail.ru; **Р. Р. Мустафин** – магистрант той же кафедры; **Э. Ф. Хабибуллина** – магистрант той же кафедры; **О. А. Решетник** – д-р техн. наук, проф, зав. каф. технологии пищевых производств КНИТУ.